

ORIGEM E DISSEMINAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DO VINHO

Sofia Fernandes Camilo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor Manuel Malfeito-Ferreira
Coorientador: Mestre Miguel Tiago Nunes Fernandes

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostava de salientar que foram várias as pessoas que, à sua maneira, contribuíram para o trabalho que aqui se encontra apresentado. Todas elas, sem exceção, fizeram com que estes meses de árduo, mas compensador, trabalho valessem a pena, e para que hoje possa olhar para todos os momentos passados com alguma melancolia.

Antes de mais, gostava de agradecer ao Professor Manuel Malfeito por me ter aceite no seu grupo de trabalho. Obrigada Professor pelos ensinamentos e constante boa disposição, e especialmente pela confiança que depositou em mim.

Em segundo, tenho de agradecer aos meninos do Laboratório 34. Ao meu coorientador Miguel, que apesar de não se chamar André, é um excelente mestre. Obrigado Miguel por todos os ensinamentos de biologia molecular e por teres aturado os meus momentos de desespero quando tudo parecia correr mal. À Joana agradeço a contagiante boa disposição, e por ser a minha fiel aliada na luta contra as ideias malucas dos dois meninos do laboratório. Como vês Joana, apesar de nos teres abandonado durante dois meses, não me esqueci de ti.

À Carla pela preciosa ajuda com as encomendas e por se mostrar sempre disposta a ajudar; à Dona Manuela por se ter mostrado incansável no seu trabalho, e que, apesar de ser bastante reservada, demonstrou ter um grande sentido de humor e conseguiu animar todas as “madrugadas” passadas no laboratório; e à Dona Lena pela constante boa disposição e alegria.

À Madalena, que diz que me chateou tanto durante estes últimos meses, que quando acabar a tese não me vai falar durante um mês. Obrigada Madalena por teres tanta paciência para os meus momentos de desespero e vê se me falas quando acabarmos a tese porque temos de fazer uma grande festa.

À minha irmã Inês que, apesar de ser de Humanidades e não perceber nada do assunto, leu várias vezes este trabalho. Obrigada Inês pela paciência e já sabes que quando isto acabar vou ter todo o tempo do Mundo para fazer tudo o que quiseses, e que até agora foi ficando para trás.

Aos meus pais por me terem apoiado durante todos estes meses e por sempre dizerem que eu era capaz, apesar dos muitos dias em que cheguei a casa a dizer que nunca ia conseguir acabar a tempo. Obrigada Mamã Alice e Tozé!

Agradeço também à minha avó pela excessiva preocupação e por me perguntar várias vezes ao longo destes meses “Filha, quando acabares isto vais ter emprego?”. Não sei avó mas daqui a uns dias espero poder dizer-te.

Por fim, e não menos importante, agradeço ao meu Miguel que tal como eu passou por esta longa prova de fogo e que, apesar de ter as suas próprias preocupações, teve sempre paciência para os

meus longos momentos de desespero. E sim, prometo que assim que acabarmos isto vamos ter as tão merecidas férias!

Peço desculpa se me esqueci de referir alguém, mas foram tantas as pessoas que foram contribuindo para este trabalho que me posso ter esquecido de alguém.

A todos os que referi e aos que me posso ter esquecido de referir, Muito Obrigada!

RESUMO

No fabrico de vinho podem estar envolvidos diversos microrganismos como leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Porém, apesar de existir uma vasta quantidade de informação sobre os microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, ainda está por descobrir a sua origem e persistência em ambientes próximos das vinhas, durante todo o ano. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade microbiana associada aos ambientes relacionados com a vinha, ao longo do ano, de maneira a perceber a disseminação e preponderância dos microrganismos pertencentes a este consórcio. Para tal, procedeu-se à análise microbiana de solos, cascas de árvores, insetos, folhas de videira, ao longo do ano, e de uvas, mosto e equipamento de adega. Os microrganismos isolados foram submetidos a testes fenotípicos e consoante o resultado foram selecionados para identificação molecular. Assim, constatou-se que, nestes ambientes, a preponderância dos microrganismos do consórcio é bastante baixa, tendo sido apenas isolados microrganismos associados à microbiota do vinho, em árvores, insetos, solos e uvas danificadas. Contudo, no mosto e no equipamento de adega a maioria dos microrganismos isolados pertencia ao consórcio microbiano do vinho. Assim, ficam ainda por descobrir quais os reservatórios preferenciais dos microrganismos pertencentes ao consórcio do vinho.

Palavras-chave: vinho, consórcio microbiano do vinho, ambiente, diversidade microbiana, identificação molecular.

ABSTRACT

During the production of wine, various microorganisms may be involved such as yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. However, although there is a vast amount of information on the microorganisms that belong to the wine microbial consortium, its origin and persistence in environment close to the vineyard, through the year, has not been unraveled, yet. The aim of this study was to evaluate the microbial diversity associated with vineyard's environments, through the year, to understand consortium microorganisms' spread and prevalence. Soils, bark trees, insects, grapevine leaves, grapes, must and cellar equipment were analyzed. The isolated microorganisms were submitted to phenotypic tests and according to the results were selected to molecular identification. Therefore, it was noted that, in these environments, the consortium microorganisms' prevalence was very low. Consequently, these microorganisms were only found on trees, insects, soils and damaged grapes. Nonetheless, in must and cellar equipment most of the isolated microorganisms belonged to wine microbial consortium. Thus, it remains to find which are the reservoirs preferred by wine consortium microorganisms.

Keywords: wine, wine microbial consortium, environment, microbial diversity, molecular identification.

EXTENDED ABSTRACT

Wine microbial consortium is composed by many microorganisms, such as yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria and most of them have origin in grapes. Nonetheless, grapes' microbiome can be constituted by several microorganisms which do not have the capacity to grow and to develop in wine, for instance basidiomycetous yeasts and filamentous fungi, because the wine has high ethanol concentration, low pH and low nutrients concentration. However, consortium microorganisms can positively or negatively influence the production of this beverage. Some of them are responsible for the fermentation (e.g. ascomycetous yeasts), while others can change the characteristics of the final product (e.g. acetic acid bacteria). Nevertheless, although there is a vast amount of information on grapes' microbiome and on microorganisms that belong to the wine microbial consortium, its origin and persistence in environment close to the vineyard, through the year, has not been unraveled, yet. The aim of this study was to evaluate the microbial diversity associated with vineyard's environments, through the year, to understand consortium microorganisms' spread and prevalence.

To achieve the aim of this study several possible wine consortium microorganisms' reservoirs, such as soils, bark trees, insects and grapevine leaves, were analyzed. During the *véraison* it was analyzed cellar equipment and sound grapes. In the harvest it was also analyzed damaged grapes and must. All the isolated microorganisms were submitted to phenotypic tests and according to the results were selected to molecular identification.

Through the year, it was possible to conclude that, despite the enormous microbial diversity in these environments, the consortium microorganisms' prevalence is very low. On one hand, yeasts associated with microbial consortium of wine were isolated in every analyzed periods. On the other hand, acetic acid bacteria were only found in winter and in *véraison* and lactic acid bacteria were only found during the *véraison* and the harvest. However, it was only isolated microorganisms associated with wine on trees, soils, insects and damaged grapes. Nonetheless, it was not possible to isolate any wine consortium microorganism on grapevine leaves and sound grapes, maybe due to its low concentration on these locals.

Some yeasts that belong to the wine microbial consortium, and that were not found in any analyzed reservoir, were isolated on must and cellar equipment (e.g. *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans* and *Saccharomyces cerevisiae*). This result suggests that these microorganisms were in low concentration on grapes. So that, they were not isolated on these berries. Nevertheless, it was not isolated any bacteria associated with wine microbiome on must and cellar equipment.

In conclusion, microorganisms of the wine consortium are not found in high levels, through the year, on the analyzed reservoirs. Moreover, the majority of consortium microorganisms is probably in low concentrations on analyzed environments. As a result, it was not possible to isolate them.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
EXTENDED ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS	1
1. Revisão da Literatura	2
1.1 O papel do vinho na alimentação	3
1.2 Controlo do crescimento microbiano no vinho	3
1.2.1 Dióxido de enxofre	4
1.2.2 Dimetildicarbonato	4
1.2.3 Lisozima	4
1.3 Consórcio microbiano do vinho	5
1.3.1 Leveduras	5
1.3.2 Bactérias lácticas	7
1.3.3 Bactérias acéticas	9
1.4 Caracterização da microbiota da uva	10
1.4.1 Leveduras	11
1.4.2 Bactérias lácticas	12
1.4.3 Bactérias acéticas	12
1.5 Possíveis reservatórios de microrganismos associados ao vinho	12
1.5.1 Insetos	12
1.5.2 Solo	13
1.5.3 Árvores	14
1.5.4 Videira	14
1.5.5 Adega	15
1.6 Métodos de seleção e identificação de microrganismos	15
1.6.1 Meios de cultura	15
1.6.2 Fenotípicos	16
1.6.2.1 Leveduras	16
1.6.2.2 Bactérias	16
1.6.3 Moleculares	17
1.6.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
1.6.3.2 Eletroforese	18
1.6.3.3 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)	18
1.6.3.4 Sequenciação	19
2. Materiais e Métodos	21

2.1 Recolha de amostras.....	22
2.1.1 Solos.....	22
2.1.2 Troncos de árvores.....	22
2.1.3 Insetos.....	22
2.1.4 Folhas de videira.....	22
2.1.5 Uvas.....	22
2.1.6 Adega.....	23
2.1.7 Mosto.....	23
2.2 Seleção de microrganismos.....	23
2.2.1 Solos.....	24
2.2.2 Insetos.....	24
2.2.3 Troncos de árvores, folhas de videira e uvas.....	24
2.2.4 Adega.....	25
2.2.5 Mosto.....	25
2.3 Purificação dos microrganismos.....	25
2.4 Testes fenotípicos.....	25
2.4.1 Leveduras.....	25
2.4.1.1 Observação microscópica.....	25
2.4.1.2 Hidrólise da ureia.....	25
2.4.2 Bactérias.....	26
2.4.2.1 Coloração de Gram.....	26
2.4.2.2 Teste da catalase.....	26
2.4.2.3 Teste da oxidase.....	26
2.5 Métodos moleculares de diagnóstico.....	26
2.5.1 Ensaaios preliminares.....	26
2.5.2 Leveduras.....	27
2.5.2.1 Extração de DNA.....	27
2.5.2.2 Amplificação de DNA.....	27
2.5.2.3 Restrição do DNA amplificado.....	27
2.5.2.4 Sequenciação do DNA amplificado.....	28
2.5.3 Bactérias lácticas.....	28
2.5.3.1 Extração de DNA.....	28
2.5.3.2 Amplificação de DNA.....	28
2.5.3.3 Restrição do DNA amplificado.....	28
2.5.3.4 Sequenciação do DNA amplificado.....	29
2.5.4 Bactérias acéticas.....	29
2.5.4.1 Extração de DNA.....	29
2.5.4.2 Amplificação de DNA.....	29

2.5.4.3	Restrição do DNA amplificado.....	30
2.5.4.4	Sequenciação do DNA amplificado	30
3.	Resultados e discussão.....	31
3.1	Ensaio preliminares de otimização da amplificação de DNA	32
3.1.1	Ajuste da concentração de cloreto de magnésio	32
3.1.2	Ajuste da temperatura de emparelhamento	32
3.1.2.1	Leveduras	32
3.1.2.2	Bactérias lácticas.....	33
3.1.2.3	Bactérias acéticas.....	34
3.2	Identificação de microrganismos isolados durante o inverno	35
3.2.1	Leveduras	36
3.2.1.1	Testes fenotípicos.....	36
3.2.1.2	Identificação dos isolados	36
3.2.2	Bactérias	38
3.2.2.1	Testes fenotípicos.....	38
3.2.2.2	Identificação dos isolados	38
3.3	Identificação de microrganismos isolados durante a primavera	41
3.3.1	Leveduras	41
3.3.1.1	Testes fenotípicos.....	41
3.3.1.2	Identificação dos isolados	41
3.3.2	Bactérias.....	42
3.3.2.1	Testes fenotípicos.....	42
3.3.2.2	Identificação dos isolados	42
3.4	Identificação de microrganismos isolados durante o verão, na época do pintor	44
3.4.1	Leveduras	45
3.4.1.1	Testes fenotípicos.....	45
3.4.1.2	Identificação dos isolados	45
3.4.2	Bactérias	46
3.4.2.1	Testes fenotípicos.....	46
3.4.2.2	Identificação dos isolados	46
3.5	Identificação de microrganismos isolados no verão, na época da vindima	49
3.5.1	Leveduras	49
3.5.1.1	Testes fenotípicos.....	49
3.5.1.2	Identificação dos isolados	50
3.5.2	Bactérias.....	53
3.5.2.1	Testes fenotípicos.....	53
3.5.2.2	Identificação dos isolados	53
3.6	Avaliação da diversidade microbiana da vinha, ao longo de todo o ano	56

3.7	Origem e disseminação dos microrganismos do consórcio microbiano do vinho	58
4.	Conclusões	61
5.	Referências Bibliográficas	63
6.	Anexos	75
Anexo 1 – Localização dos locais de recolha das amostras.....		76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação no inverno.	37
Tabela 2 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação no inverno.....	40
Tabela 3 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na primavera.	42
Tabela 4 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na primavera.....	44
Tabela 5 – Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação, na época do pintor.....	46
Tabela 6 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação na época do pintor.....	47
Tabela 7 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na época do pintor.....	48
Tabela 8 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na época da vindima.	51
Tabela 9 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na época da vindima (cont).	52
Tabela 10 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na época da vindima (cont).	53
Tabela 11 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação na época da vindima.	54
Tabela 12 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na época da vindima.	55
Tabela 13 – Origem e Disseminação dos microrganismos associados ao consórcio microbiano do vinho.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fermentação alcoólica.....	6
Figura 2 - Fermentação malolática.....	8
Figura 3 - Metabolismo do etanol pelas bactérias acéticas.	10
Figura 4 – Sequenciação de DNA pelo método de Sanger.	19
Figura 5 – Perfil eletroforético das diferentes concentrações de MgCl ₂ testadas.	32
Figura 6 – Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers ITS1 e ITS4.	33
Figura 7 - Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers PA e PH.....	33
Figura 8 – Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers Ac1 e Ac3.....	34
Figura 9 – Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers AcA e AcB	35
Figura 10 – Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados no inverno.	35
Figura 11 - Perfil eletroforético da amplificação do DNA das leveduras selecionadas para identificação, no inverno.....	36
Figura 12 – Perfil eletroforético da restrição dos produtos de PCR de duas leveduras conhecidas....	37
Figura 13 - Perfil eletroforético da amplificação do DNA, com os <i>primers</i> Ac1 e Ac3, das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação, no inverno.	38
Figura 14 - Perfil eletroforético do nested PCR, com os primers AcA e AcB, das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação, no inverno.	39
Figura 15 – Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados na primavera.	41
Figura 16 - Perfil eletroforético da amplificação do DNA das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na primavera	43
Figura 17 - Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados no verão, na época do pintor.....	45
Figura 18 - Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados no verão, na época da vindima.	49
Figura 19 – Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados ao longo do ano	56
Figura 20 – Preponderância dos microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, por reservatório, ao longo do ano.....	57
Figura 21 – Quantidade de espécies microbianas, associadas à microbiota do vinho, isoladas em cada época do ano, por reservatório.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

DMDC	Dimetildicarbonato
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphisms
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

As uvas possuem uma ecologia microbiana bastante complexa, uma vez que dela fazem parte diversos microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Renouf *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2012a). Contudo, alguns microrganismos, como leveduras basidiomicetas e fungos filamentosos, apenas podem ser encontrados nas uvas, enquanto outros detêm a capacidade de sobreviver, desenvolver-se e, por vezes, alterar o vinho (Barata *et al.*, 2012a). Assim, estes últimos fazem parte do consórcio microbiano do vinho, como é o caso de leveduras ascomicetas, bactérias lácticas e bactérias acéticas (Renouf *et al.*, 2007). No entanto, a percentagem destes microrganismos nas uvas depende tanto do estado de maturação das mesmas, como da disponibilidade de nutrientes, sendo as bactérias lácticas os microrganismos menos encontrados (Bae *et al.*, 2006; Barata *et al.*, 2012a; Setati *et al.*, 2012). Desta forma, uvas pouco maduras, ou seja, até à época do pintor, são dominadas por leveduras basidiomicetas e fungos filamentosos, não tendo estes qualquer influência na produção de vinho (Sabate *et al.*, 2002; Renouf *et al.*, 2005). Na época da vindima, e uma vez que as uvas se encontram num estado de maturação mais avançado e há uma maior disponibilidade de nutrientes, os principais microrganismos isolados são leveduras ascomicetas fracamente fermentativas, essencialmente dos géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Pichia* (Renouf *et al.*, 2005). Porém, caso a película deste fruto se encontre danificada, ocorre uma mudança da microbiota, podendo ser encontrados géneros de leveduras ascomicetas com elevada atividade fermentativa, como é o caso de *Zygosaccharomyces* e *Torulaspora* (Barata *et al.*, 2008), e bactérias acéticas dos géneros *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acetobacter* (Du Toit e Pretorius, 2002; Mas *et al.*, 2007). No entanto, e ao contrário do que seria esperado os principais microrganismos responsáveis pelo fabrico do vinho – *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni* – raramente são encontrados na microbiota da uva (Bae *et al.*, 2006; Barata *et al.*, 2012a).

Todavia, e apesar de existir uma enorme diversidade de informação sobre a microbiota da uva e sobre os microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, ainda está por esclarecer qual a sua origem e persistência no ambiente próximo das vinhas, durante todo o ano. Este trabalho surge no seguimento da investigação realizada no Laboratório de Microbiologia, do Instituto Superior de Agronomia, sobre a ecologia microbiana das uvas, pretendendo-se alargar os substratos de isolamento de microrganismos relacionados com o vinho. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar a diversidade microbiana associada aos ambientes relacionados com a vinha, ao longo de todo o ano, de forma a perceber a disseminação e a preponderância das espécies pertencentes ao consórcio microbiano do vinho.

1. Revisão da Literatura

1.1 O papel do vinho na alimentação

A arte de fazer vinho é tão antiga como a civilização humana (Pretorius *et al.*, 1999), sendo este, atualmente, uma das bebidas mais consumidas no Mundo (Bisson *et al.*, 2002). Segundo a International Organisation of Vine and Wine (2012), o consumo mundial deste bem apresenta oscilações desde o ano de 2000, ano em que se situava nos 225 665 mil hectolitros, tendo atingido o seu máximo em 2007 (251 077 mil hectolitros). Em 2009, verificou-se um pequeno decréscimo do seu consumo, devido à atual crise económica, o que correspondeu a uma queda de 3,2%, face ao ano anterior (International Organisation of Vine and Wine, 2012; International Organisation of Vine and Wine, 2013a). Já em 2010, voltou a verificar-se um aumento do consumo, tendo atingido em 2012 os 244 000 mil hectolitros (International Organisation of Vine and Wine, 2013b).

Hoje em dia, o consumo desta bebida pode ser visto como uma componente cultural de vários países, uma forma de entretenimento ou apenas um maneira de melhorar a saúde, uma vez que é visto com um alimento funcional, isto é, um alimento que pode trazer benefícios para a saúde (Hasler, 1998; Bisson *et al.*, 2002). Muitos dos efeitos benéficos do vinho, especialmente do tinto, devem-se aos seus componentes, nomeadamente resveratrol, compostos fenólicos, quercetina e viniferina (Leifert e Abeywardena, 2008; Pérez-López *et al.*, 2009; Riedel *et al.*, 2012). Assim, o vinho é capaz de, entre outros, diminuir a incidência de doenças cardiovasculares e de diabetes, uma vez que o resveratrol pode diminuir os níveis de colesterol no sangue e aumentar a sensibilidade à insulina; e interferir em doenças inflamatórias, como a arteriosclerose, visto que a quercetina e a viniferina são capazes de inibir a atividade de várias enzimas responsáveis por estas perturbações (Frankel *et al.*, 1993 [citado em Riedel *et al.*, 2012]; Bertelli e Das, 2009 [citado em Chrysoshoou e Stefanadis, 2013]).

Um dos casos mais flagrantes e controversos dos efeitos benéficos do vinho na saúde é o chamado “Paradoxo Francês”, que se traduz na baixa incidência de doenças coronárias na população francesa associada ao moderado consumo de vinho, especialmente tinto, apesar da prática de uma dieta rica em gorduras saturadas (Renaud e de Lorgeril, 1992). Desta forma, parece correto afirmar que o consumo moderado desta bebida pode trazer benefícios para a saúde, sendo, por isso, um alimento funcional.

1.2 Controlo do crescimento microbiano no vinho

Uma vez que o vinho está sujeito a contaminação por microrganismos de alteração, o controlo do crescimento microbiano durante o seu fabrico é fundamental, não só para maximizar a atividade fermentativa de leveduras do género *Saccharomyces*, mas também para prevenir o crescimento de bactérias e leveduras indesejadas (Fugelsang e Edwards, 2007a). Assim, o uso de conservantes, como o dióxido de enxofre (SO₂), torna-se essencial, uma vez que estes conseguem inibir o crescimento microbiano (Fugelsang e Edwards, 2007a; Costa *et al.*, 2008).

1.2.1 Dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre, vulgarmente conhecido como sulfuroso, é um dos conservantes mais utilizados no vinho, dado que é capaz de controlar a microbiota fermentativa sem ter qualquer efeito em leveduras do género *Saccharomyces*, pois apenas apresenta toxicidade elevada para leveduras não pertencentes a este género (Henick-Kling *et al.*, 1998). Contudo, a concentração necessária para prevenir o crescimento destes microrganismos varia de acordo com o pH, temperatura e quantidade de álcool dos vinhos, densidade e variedade populacional, fase de crescimento e com a sensibilidade intrínseca de cada espécie ao SO₂ (Henick-Kling *et al.*, 1998; Fugelsang e Edwards, 2007a). Este composto é capaz de inibir a atividade de vários microrganismos, pois causa a rutura de pontes dissulfídicas em proteínas, reage com alguns cofatores, como o NAD⁺ e FAD, e reduz a concentração de nutrientes essenciais para os microrganismos (Fugelsang e Edwards, 2007a). Porém, algumas das bactérias e leveduras indesejadas possuem grande resistência a este composto, como é o caso de certas leveduras do género *Pichia*, *Schizosacharomyces* e *Zygosacharomyces*, o que pode estar relacionado com as taxas de difusão através das membranas celulares e com a produção de compostos que inativam o SO₂ (Fugelsang e Edwards, 2007a).

O Regulamento (CE) N° 606/2009, de 10 de junho de 2009, veio regular os limites máximos deste conservante nos vinhos, tendo sido estabelecida uma quantidade máxima, para os vinhos tintos e brancos e rosados com menos de 5 g.L⁻¹ de teor em açúcares (expressos em glucose mais frutose) de 150 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, respetivamente; e de 200 mg.L⁻¹ para os vinhos tintos e 250 mg.L⁻¹ para os brancos e rosados, com mais de 5 g.L⁻¹ de açúcares. O teor total de SO₂ em vinhos licorosos não pode exceder as 150 mg.L⁻¹, no caso de vinhos com um teor de açúcares inferior a 5 g.L⁻¹; e as 200 mg.L⁻¹ em vinhos cujo teor de açúcares seja igual ou superior a 5 g.L⁻¹. Quanto aos vinhos espumantes, estes não podem ultrapassar as 185 mg.L⁻¹, no caso de todas as categorias de vinhos espumantes de qualidade, e as 235 mg.L⁻¹, no caso dos outros vinhos espumantes.

1.2.2 Dimetildicarbonato

O dimetildicarbonato (DMDC) é outro dos conservantes utilizados no vinho, porque este é capaz de desnaturar enzimas microbianas responsáveis pela via fermentativa, tais como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a álcool desidrogenase (Fugelsang e Edwards, 2007a). Todavia, a eficácia deste composto é bastante variável, tendo este mostrado pouca eficácia, quando aplicado dentro dos limites legais (200 mg.L⁻¹ [Regulamento (CE) N° 643/2006]), contra bactérias acéticas e lácticas (Costa *et al.*, 2008).

1.2.3 Lisozima

Este conservante natural é utilizado, em vinhos, no controlo de bactérias lácticas, como *Lactobacillus* e *Pediococcus*, uma vez que é capaz de provocar a sua lise, ao interagir com os polipéptidos da parede celular. Contudo, esta enzima não é eficaz contra bactérias acéticas – visto que possuem uma camada protetora de peptidoglicanos (Bartowsky, 2009) – nem contra células eucariotas, como as leveduras (Fugelsang e Edwards, 2007a). Assim, este conservante é bastante útil no controlo de

Lactobacillus durante a fermentação alcoólica e no impedimento da fermentação malolática, após o engarrafamento (Gerbaux *et al.*, 1999).

De acordo com o Regulamento (CE) Nº 643/2006, de 27 de abril de 2006, o limite máximo desta enzima, em vinhos, é de 500 mg.L⁻¹.

1.3 Consórcio microbiano do vinho

O consórcio microbiano do vinho é constituído por diversos microrganismos, tais como leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, tendo a sua maioria origem nos bagos de uva (Barata *et al.*, 2012a). No entanto, para serem capazes de proliferar no vinho, estes têm de ser capazes de resistir a elevadas quantidades de etanol (cerca de 13,5% v/v), a um baixo pH (cerca de 3,5) e a diminutas concentrações de nutrientes (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Desta forma, os microrganismos associados a este consórcio podem ser inseridos em 3 grupos – fermentativos, pouco preocupantes ou de alteração (Barata *et al.*, 2012a). O primeiro grupo é constituído por espécies fermentativas, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*, que são responsáveis pela conversão de açúcares e ácido málico em etanol e ácido láctico, respetivamente (Renouf *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2012a). Os microrganismos pouco preocupantes, como as bactérias acéticas, são facilmente controláveis e não possuem a capacidade de alterar o vinho quando aplicadas as boas práticas de fabrico (Bartowsky e Henschke, 2008; Barata *et al.*, 2012a). Estas consistem numa adequada lavagem e sanitização dos equipamentos utilizados na vinificação, na utilização de conservantes ou na utilização de processos físicos como a filtração (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Os microrganismos de alteração, tais como *Dekkera bruxellensis* e *Pediococcus* spp., são capazes de alterar as características do produto final, mesmo quando aplicadas as boas práticas de fabrico (Lonvaud-Funel, 1999; Barata *et al.*, 2012a).

1.3.1 Leveduras

A fermentação alcóolica (Figura 1) do mosto é um complexo processo microbiano que envolve um desenvolvimento sequencial de vários géneros de leveduras, sendo estes fortemente afetados pelas condições físico-químicas – pH, concentração de açúcar, quantidade de compostos fenólicos – e pelo processo de vinificação – temperatura, quantidade de SO₂ adicionado e quantidade de oxigénio (Bisson e Joseph, 2009; Renault *et al.*, 2013). Porém, a fermentação alcóolica do vinho pode ser dividida em dois tipos – fermentação espontânea e fermentação com utilização de fermentos (Bisson e Joseph, 2009). A primeira caracteriza-se por uma fermentação inicialmente conduzida por leveduras não *Saccharomyces*, oriundas das uvas e do ambiente de adega, tais como *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* e, por vezes, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailli* e *Schizosaccharomyces pombe* (Fleet, 2003), até estas atingirem uma população com cerca de 10⁶-10⁷ UFC.mL⁻¹ (Zott *et al.*, 2008). De seguida, e após a depleção gradual do nível de nutrientes e o aumento progressivo da concentração de etanol, as espécies menos tolerantes são eliminadas e é favorecido o desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae*,

tornando-se esta a levedura predominante, completando assim a fermentação (Heard e Fleet, 1985). Este tipo de processo pode ser benéfico para o vinho, pois tem um impacto positivo nas propriedades aromáticas e sensoriais, devido à produção de enzimas envolvidas na conversão de precursores não aromáticos, presentes nas uvas, em compostos aromáticos (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001; Renouf *et al.*, 2005; Domizio *et al.*, 2010). Contudo, a fermentação com utilização de fermentos é totalmente realizada por leveduras do género *Saccharomyces*, tais como *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces bayanus*, sendo necessário proceder à sua inoculação, o que faz com que a conversão dos açúcares, presentes no vinho – glucose e frutose –, em etanol seja realizada mais rapidamente (Heard e Fleet, 1985; Pretorius, 2000).

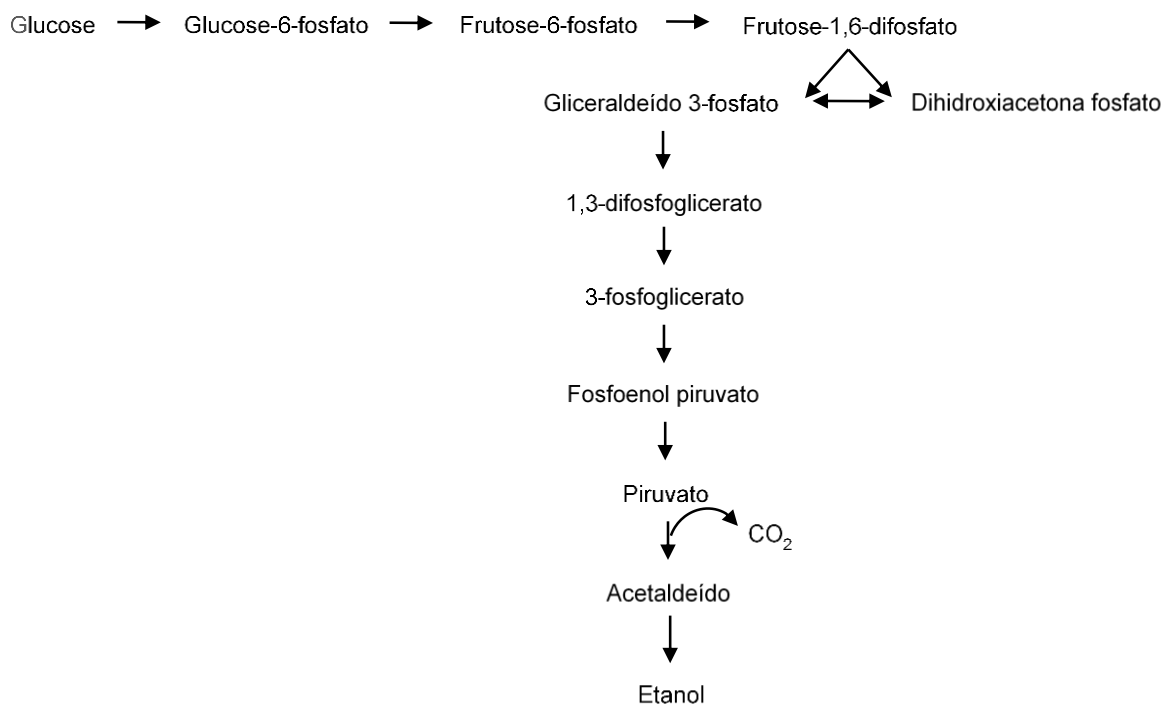


Figura 1 - Fermentação alcoólica. (Adaptado de Pretorius, 2000)

No entanto, as leveduras, para além de terem um efeito benéfico no vinho, podem também ter efeitos indesejados, ao alterarem as características finais do produto (Fleet, 2003). As leveduras apiculadas, tais como *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, são capazes de produzir metabolitos, como o ácido acético, que confere um cheiro a vinagre, principalmente em vinhos brancos com um longo período de armazenamento, e em vinhos tintos com um longo período de maceração pré fermentativa (Plata *et al.*, 2003; Malfeito-Ferreira, 2014). Todavia, estas leveduras são inibidas durante a fermentação alcoólica e podem ser facilmente controladas quando cumpridas as boas práticas de fabrico (Malfeito-Ferreira, 2014).

As leveduras do género *Pichia* e *Candida* são também capazes de alterar o vinho através da produção de acetaldeído, ácido volatéis e ésteres, e da formação de uma película na superfície do

mesmo, o que pode ser explicado pela sua natureza aeróbia e de rápido crescimento (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Assim, estes microrganismos podem ser um problema quando o vinho se encontra em barricas e não foi criado um ambiente anaeróbio, durante o armazenamento ou quando a contaminação inicial é elevada, o que pode ser indicador de más práticas de fabrico (Fleet, 2003; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003) .

Apesar de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* serem as principais leveduras fermentativas, estas podem reduzir compostos sulfurícos e produzir fenóis voláteis, sendo ambos responsáveis por maus aromas, como aroma a cebola e farmácia, respetivamente (Bell e Henschke, 2005; Swiegers *et al.*, 2005). Outra levedura fermentativa, *Zygosaccharomyces bailii*, é capaz de crescer em ambientes com pouco oxigénio, sendo também bastante resistente aos conservantes, podendo assim desenvolver-se em vinhos já engarrafados e provocar uma turbidez, especialmente em vinhos brancos, e uma produção elevada de ésteres e ácido acético (Du Toit e Pretorius, 2000; Malfeito-Ferreira, 2014).

As leveduras do género *Brettanomyces*, ou as suas teleomorfos *Dekkera*, especialmente *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, são os principais agentes de alteração do vinho, dado a sua grande capacidade de produção de fenóis voláteis e ácido acético (Heresztyn, 1986; Ciani e Ferraro, 1997; Malfeito-Ferreira, 2011). Os fenóis voláteis são os principais responsáveis pela presença de maus aromas, por exemplo, em vinhos tintos, o 4-etilfenol confere um cheiro a couro ou “suor de cavalo” (Malfeito-Ferreira e Loureiro, 2003). A origem destes compostos, no vinho, deve-se à capacidade destas leveduras descarboxilarem os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido p-cumárico, em vinifenóis, que são posteriormente reduzidos em etil derivados (Heresztyn, 1986).

Assim, pode concluir-se que as leveduras conseguem produzir diversos compostos aromáticos, podendo estes ser benéficos ou indesejáveis, dependendo da concentração a que se encontram no produto final. Por exemplo, enquanto uma baixa concentração de 4-etilfenol confere uma certa complexidade ao vinho, uma elevada concentração do mesmo composto atribui ao vinho aromas desagradáveis (Malfeito-Ferreira e Loureiro, 2003).

1.3.2 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas são um grupo diverso de bactérias Gram positiva, catalase negativa e oxidase negativa, que podem aparecer no mosto, oriundas quer das uvas quer do equipamento de adega (Lonvaud-Funel, 1999; Rodas *et al.*, 2003). No mosto, a sua população varia entre as 10^2 e as 10^4 UFC.mL⁻¹, dependendo do pH do mesmo, podendo ser encontrados quatro géneros distintos – *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* (Lonvaud-Funel, 1999). Durante os primeiros dias da fermentação alcoólica a sua população tende a aumentar, ocorrendo um decréscimo até ao final desta fermentação, devido ao aumento da concentração de etanol e diminuição do pH, sendo a bactéria predominante, nesta altura, *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel, 1999). No final da fermentação alcoólica, quando a população bacteriana atinge as 10^6 UFC.mL⁻¹, inicia-se a fermentação malolática, responsável pela descarboxilação de ácido L-málico em ácido L-lático

(Figura 2), sendo esta fermentação essencial para a redução da acidez, para o aumento das características organolépticas e para o aumento da estabilidade microbiológica do vinho (Lonvaud-Funel, 1999; Versari *et al.*, 1999; Lerm *et al.*, 2010).

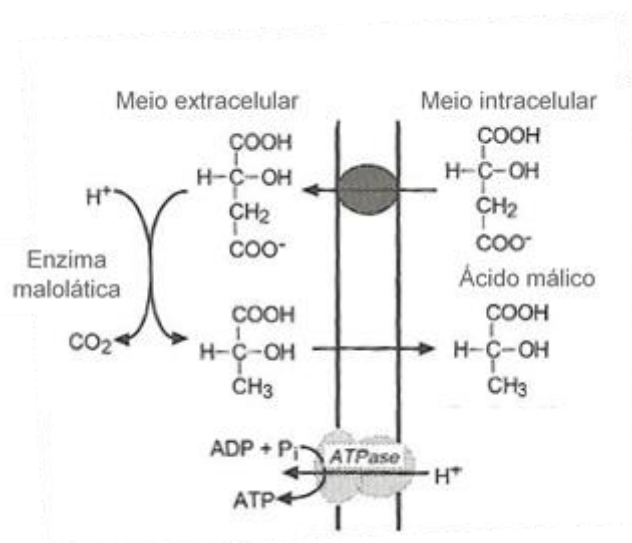


Figura 2 - Fermentação malolática. (Adaptado de Fugelsang e Edwards, 2007e)

Todavia, após a fermentação malolática estar completa e em alguns vinhos com pH elevado, as restantes bactérias lácticas – *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Pediococcus* – continuam a metabolizar os açúcares residuais e a produzir metabolitos secundários, modificando os aromas do vinho e alterando as suas características finais (Lonvaud-Funel, 1999; Fugelsang e Edwards, 2007b; Lerm *et al.*, 2010). Durante esta fermentação, um dos principais compostos produzidos por *Oenococcus oeni* é o diacetil, contribuindo para a mudança de aroma, sendo capaz de conferir um aroma a manteiga ou nozes (Martineau *et al.*, 1995; Swiegers *et al.*, 2005). Assim, concentrações entre os 1-4 mg.L⁻¹ contribuem para um aumento da complexidade do vinho, enquanto concentrações acima das 5 mg.L⁻¹ podem alterar o vinho de forma negativa (Rankine *et al.*, 1969; Swiegers *et al.*, 2005).

Os ésteres, especialmente lactato de etilo e dietil succinato, são outros dos compostos produzidos pelas bactérias lácticas – *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus* e *Lactobacillus* sp. – durante a fermentação malolática, podendo dar origem a aromas frutados ou a verniz, dependendo da concentração em que se encontram (Maicas *et al.*, 1999; Swiegers *et al.*, 2005; Lerm *et al.*, 2010). Tal como as leveduras, algumas bactérias lácticas, como as pertencentes ao género *Lactobacillus*, são também capazes de produzir vinil e etil derivados a partir dos ácidos p-cumárico e ferrúlico, presentes no vinho, embora em menores quantidades que *Brettanomyces bruxellensis* (Lonvaud-Funel, 1999; Lerm *et al.*, 2010).

Algumas estirpes de *Pediococcus damnosus* são preocupantes quando se fala de qualidade do vinho, pois conseguem produzir exopolissacáridos, como glucano, responsáveis por um aumento da viscosidade, principalmente quando o vinho se encontra em cubas (Lonvaud-Funel, 1999).

Assim, tal como para as leveduras, pode concluir-se que as bactérias lácticas, ao consumirem os açúcares residuais ou alguns compostos produzidos pelas leveduras, e ao transformarem alguns compostos já existentes no vinho, podem ter, dependendo das estirpes presentes e das concentrações dos compostos produzidos, um efeito benéfico ou um efeito indesejado nas características organoléticas e sensoriais do vinho. Porém, além de poderem alterar a qualidade organolética e sensorial, podem também produzir compostos prejudiciais para a saúde humana, tais como aminas biogénicas e etil carbamato (Lerm *et al.*, 2010). As aminas biogénicas, principalmente produzidas por bactérias dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, são originadas através da descaboxilação de aminoácidos naturalmente presentes no vinho (Shalaby, 1997; Moreno-Arribas *et al.*, 2003), enquanto o etilcarbamato tem origem no catabolismo da arginina, sendo os principais responsáveis *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus plantarum* (Uthurry *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2009).

1.3.3 Bactérias acéticas

As bactérias acéticas são um grupo de bactérias Gram negativa, catalase variável e oxidase negativa, que podem ser encontradas em produtos com algum teor de álcool, como o vinho (Gosselé *et al.*, 1983; Mas *et al.*, 2007). No vinho, estes microrganismos são oriundos quer da uva quer do equipamento de adega, sendo o seu crescimento inibido durante a fermentação alcóolica, dado a seu carácter aeróbio (Poblet *et al.*, 2000; Du Toit e Pretorius, 2002, Mas *et al.*, 2007). Assim, devido à sua elevada concentração no mosto, *Gluconobacter oxydans*, é a principal bactéria acética presente durante as primeiras fases desta fermentação, podendo também ser encontradas *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconacetobacter hansenii*, que, caso se desenvolvam rapidamente, podem levar a uma diminuição da taxa de fermentação ou a uma paragem da mesma (Joyeux *et al.*, 1984; Du Toit e Lambrechts, 2002; Guillamón e Mas, 2011). Contudo, no final da fermentação alcóolica é ainda possível isolar algumas bactérias acéticas, mais resistentes ao etanol e ao dióxido de carbono, principalmente *Acetobacter aceti*, seguida de *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter oeni*, *Acetobacter hansenii*, *Gluconobacter oxydans* e *Gluconacetobacter liquefaciens*, embora estas últimas estejam em menores concentrações que nas fases iniciais da fermentação (González *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006). Após a fermentação alcóolica, é, então, criado o ambiente ideal para o seu desenvolvimento, visto que é incorporado bastante oxigénio quando o vinho é transferido dos tanques de fermentação para as cubas de armazenamento (Millet e Lonvaud-Funel, 2000). Desta forma, as bactérias acéticas presentes no vinho durante o armazenamento, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconacetobacter liquefaciens*, são capazes de oxidar o etanol em ácido acético, sendo este o principal produto de alteração, e acetato de etilo (Figura 3) (Joyeux *et al.*, 1984; Du Toit e Lambrechts, 2002; Mas *et al.*, 2007).

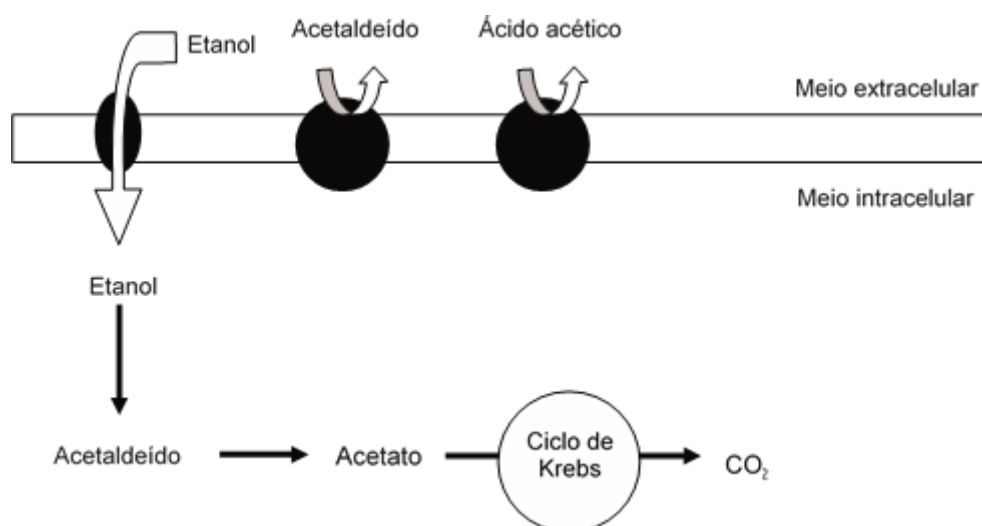


Figura 3 - Metabolismo do etanol pelas bactérias acéticas. (Adaptado de Mas *et al.*, 2007)

Apesar de ainda pouco se saber acerca do desenvolvimento das bactérias acéticas durante a fermentação malolática, alguns estudos apontam para uma concentração de cerca de 10^2 a 10^6 UFC.mL⁻¹, sendo a população maioritariamente constituída por *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter aceti* (Joyeux *et al.*, 1984; Guillaumon e Mas, 2011).

1.4 Caraterização da microbiota da uva

Como referido anteriormente, a população microbiana presente no bago de uva, no momento da vinificação, desempenha um papel fundamental no fabrico de vinho, uma vez que esta pode influenciar a sua produção e armazenamento (Renouf *et al.*, 2005; Nisiotou *et al.*, 2011; Bokulich *et al.*, 2014). No entanto, apesar de as uvas possuírem uma complexa dinâmica microbiológica, que inclui fungos filamentosos, leveduras e bactérias, apenas alguns destes microrganismos podem afetar, de forma positiva ou negativa, a produção de vinho, dado que só os pertencentes ao consórcio microbiano do vinho detêm a capacidade de sobreviver e de se desenvolverem neste produto (Renouf *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2012a). Uma vez que a diversidade microbiana da uva depende do estado de maturação da mesma e da disponibilidade de nutrientes, o consórcio microbiano deste fruto pode ser sistematizado consoante estes dois fatores, sendo os microrganismos isolados no início da maturação - essencialmente leveduras basidiomicetas e bactérias lácticas -, diferentes dos encontrados no final da mesma - leveduras ascomicetas fracamente fermentativas (Renouf *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2012a). Quando o fruto se encontra danificado são encontradas, essencialmente, bactérias acéticas e leveduras ascomicetas fortemente fermentativas (Renouf *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2012a).

Contudo, a ecologia microbiana da uva não é apenas afetada pelo estado de maturação e pela disponibilidade de nutrientes. Muitos outros fatores, como as condições climáticas, a incidência de

pragas, os tratamentos com produtos fitofarmâceuticos e fatores bióticos, como a localização geográfica da vinha e a presença de vetores microbianos, podem influenciar a densidade e diversidade populacional deste fruto (Guerra *et al.*, 1999; Mortimer e Polsinelli, 1999; Barata *et al.*, 2012a). No caso das condições climáticas, que incluem a temperatura, exposição aos raios ultravioleta, precipitação, exposição solar e ocorrência de ventos, estas podem influenciar a microbiota das uvas, pois possibilitam a necessidade de utilização de pesticidas, a proliferação de fungos, o aumento de frutos danificados ou a lixiviação dos microrganismos presentes no bago de uva (Barata *et al.*, 2012a). No que toca à aplicação de produtos fitofarmacêuticos, diversos estudos concluíram que a sua aplicação, principalmente de fungicidas, influencia a diversidade de leveduras presentes no bago de uva, ocorrendo uma diminuição acentuada de ascomicetas em uvas tratadas com estes produtos, em oposição a uvas que não sofreram qualquer tratamento (Guerra *et al.*, 1999; Ganga e Martinez, 2004; Cordero-Bueso *et al.*, 2011). Dos vetores microbianos da vinha, destacam-se os insetos, que se encontram largamente presentes e transportam uma grande quantidade de microrganismos, uma vez que vivem em simbiose, como será referido mais adiante (Ganter, 2006; Crotti *et al.*, 2010; Vásquez *et al.*, 2012).

1.4.1 Leveduras

Apesar da diversidade e do número de leveduras indígenas da uva dependerem dos vários fatores referidos acima, vários estudos apontam que a sua densidade populacional neste fruto varia entre as 10^2 e 10^4 UFC.g⁻¹, em uvas sãs (Raspor *et al.*, 2006; Chavan *et al.*, 2009; Setati *et al.*, 2012). Nestas uvas, as leveduras predominantes são pertencentes aos géneros *Kloeckera* e *Hanseniaspora*, perfazendo 50 a 75% da população total (Pretorius *et al.*, 1999). Em menor concentração, é ainda possível isolar leveduras ascomicetas dos géneros *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* e *Kluyveromyces* e leveduras basidiomicetas dos géneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus* (Guerra *et al.*, 1999; Renouf *et al.*, 2005; Raspor *et al.*, 2006; Chavan *et al.*, 2009; Setati *et al.*, 2012). No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* raramente se encontram na superfície das uvas, sendo por isso bastante difícil o seu isolamento em uvas sãs (Mortimer e Polsinelli, 1999; Fleet, 2003; Martorell *et al.*, 2006).

Todavia, uvas danificadas apresentam uma maior densidade populacional, cerca de 10^6 a 10^8 UFC.g⁻¹, devido à maior disponibilidade de nutrientes, o que pode atrair insetos, vetores de variados microrganismos (Mortimer e Polsinelli, 1999; Barata *et al.*, 2008a; Barata *et al.*, 2012a). Devido a uma maior proliferação de leveduras ascomicetas fermentativas, como, por exemplo, *Pichia* spp., *Zygosacharomyces* spp., *Zygoascus* spp. e *Torulaspora* spp., as leveduras ascomicetas dos géneros *Hanseniaspora* e *Kloeckera* deixam de ser as predominantes, ao contrário do que é verificado em uvas sãs, sendo também possível encontrar leveduras basidiomicetas (Barata *et al.*, 2008b). Contudo, apesar de nestas uvas existir uma maior concentração de leveduras é ainda difícil isolar *Saccharomyces cerevisiae*, dado estas se encontrarem em baixa concentração ou frequência (Barata *et al.*, 2012a).

Porém, apesar de serem encontradas leveduras basidiomicetas na superfície das uvas, quer sãs quer danificadas, estas não possuem qualquer importância a nível enológico, visto não serem capazes de fermentar açúcares, tolerar elevadas concentrações de etanol, nem de produzir compostos que alterem o vinho (Sabate *et al.*, 2002).

1.4.2 Bactérias lácticas

A densidade populacional das bactérias lácticas, ao contrário do que acontece com as leveduras, é fracamente afetada pelo estado de maturação da uva, variando entre as 10^2 e 10^3 UFC.g⁻¹, em uvas sãs e danificadas (Bae *et al.*, 2006; Barata *et al.*, 2012a). De entre as bactérias lácticas mais frequentemente encontradas nas uvas, destacam-se as pertencentes aos géneros *Lactobacillus* (nomeadamente *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus casei*), *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*) e *Pediococcus* (*Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus* e *Pediococcus pentasaceus*) (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Sieiro *et al.*, 1990; Renouf *et al.*, 2005; Renouf *et al.*, 2007). Contudo, tal como acontece com a principal levedura responsável pela fermentação alcoólica, também a bactéria mais importante na fermentação malolática – *Oenococcus oeni* – raramente é isolada da uva, devido à sua baixa frequência e concentração (Bae *et al.*, 2006; Nisiotou *et al.*, 2011).

1.4.3 Bactérias acéticas

Ao contrário do que acontece com as bactérias lácticas, a concentração das bactérias acéticas é fortemente afetada pelo estado de maturação da uva (Barata *et al.*, 2012a). Em uvas sãs e maduras, é possível encontrar uma população com cerca de 10 UFC.g⁻¹ de bactérias acéticas, enquanto em uvas danificadas a densidade populacional aumenta para aproximadamente 10^6 UFC.g⁻¹ (Barbe *et al.*, 2001). As principais bactérias acéticas isoladas de uvas sãs são pertencentes aos géneros *Gluconobacter*, tal como *Gluconobacter oxydans*, *Gluconoacetobacter*, nomeadamente *Gluconoacetobacter saccharivorans*, podendo também ser encontradas algumas do género *Acetobacter* (Du Toit e Pretorius, 2002). No entanto, em uvas danificadas o género *Acetobacter* é o principal encontrado, sendo as espécies mais frequentemente isoladas *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter orleanensis* e *Acetobacter syzygii* (Joyeux *et al.*, 1984; Barbe *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2014).

1.5 Possíveis reservatórios de microrganismos associados ao vinho

1.5.1 Insetos

Na vinha, os insetos encontram-se largamente associados às uvas, uma vez que uma grande variedade destes microrganismos, como abelhas, vespas, borboletas, cochonilhas e gafanhotos, visitam, infetam e alimentam-se deste fruto, nos vários estágios do seu desenvolvimento (Mortimer e Polsinelli, 1999; Barata *et al.*, 2012b). Desta forma, e como os insetos possuem uma relação de simbiose com vários microrganismos, podem contaminar as uvas com a microbiota presente no seu

corpo (Mortimer and Polsinelli, 1999; Ganter, 2006; Crotti *et al.*, 2010; Barata *et al.*, 2012b; Vásquez *et al.*, 2012), sendo muitos desses microrganismos os responsáveis pela produção e alteração do vinho.

Por exemplo, as abelhas (família *Apidae*) possuem no seu corpo várias leveduras, sendo as mais frequentemente isoladas as pertencentes aos gêneros *Dekkera/Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (Sandhu e Waraich, 1985; Zacchi e Vaughan-Martini, 2002; Brysch-Herzberg, 2004). De entre estas, encontram-se algumas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, tais como, *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Dekkera anomala* e até *Saccharomyces cerevisiae* (Sandhu e Waraich, 1985; Zacchi and Vaughan-Martini, 2002; Brysch-Herzberg, 2004). Contudo, estes insetos podem também transportar no seu corpo várias bactérias, tanto acéticas como lácticas, sendo as acéticas maioritariamente pertencentes aos gêneros *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acetobacter* (Babendreier *et al.*, 2007; Crotti *et al.*, 2010), e as bactérias lácticas dominantes pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, nomeadamente *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus kunkeei*, e *Bifidobacterium* (Babendreier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011; Neveling *et al.*, 2012; Vásquez *et al.*, 2012).

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, é também um hospedeiro de vários microrganismos, como leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas. Relativamente às leveduras, as mais abundantes no seu corpo pertencem aos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Metschnikowia* e *Rhodotorula*, podendo encontrar-se algumas pertencentes à microbiota do vinho, tais como *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala* e *Debaryomyces hansenii* (Zacchi e Vaughan-Martini, 2002; Barata *et al.*, 2012b). Tal como acontece com as abelhas, as bactérias acéticas mais frequentemente isoladas deste inseto pertencem aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Gluconobacter*, sendo possível encontrar algumas bactérias responsáveis pela alteração do vinho, como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* (Cox e Gilmore, 2007; Chouaia *et al.*, 2014). Quanto às bactérias lácticas, Cox e Gilmore (2007) isolaram, do corpo destes insetos, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*, ambas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho.

1.5.2 Solo

O solo é um reservatório de diversos microrganismos, como bactérias e leveduras, sendo a sua composição microbiana influenciada pelas condições climáticas, comunidades de plantas existentes no mesmo e pelas suas características (Willey *et al.*, 2008a). No caso das leveduras, estas podem ser encontradas em concentrações que variam desde as 10 a 10⁶ UFC.g⁻¹ de solo, sendo isoladas em maior número em solos que contêm árvores de fruto (Botha, 2006). Neste ambiente, são encontradas, em maior quantidade, leveduras basidiomicetas pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*, em detrimento das ascomicetas, maioritariamente pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Torulaspora* (Wuczkowski e Prillinger, 2004; Botha, 2006; Yurkov *et al.*, 2012). Assim, de entre os

gêneros mencionados é possível encontrar, no solo, algumas leveduras responsáveis pela produção e alteração do vinho, como *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia guilliermondii* (Botha, 2006; Yurkov *et al.*, 2012). Contudo, e apesar da sua escassez nos solos, Sniegowski *et al.* (2002) foram capazes de isolar *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus* de solos associados a carvalhos e sobreiros.

A população bacteriana dos solos pode variar entre as 10^9 e 10^{10} UFC.g⁻¹ de solo (Willey *et al.*, 2008a), sendo que, de entre as bactérias com interesse enológico, isto é, bactérias lácticas e acéticas, apenas há registos de isolamentos das primeiras, embora sejam bastante escassas (Chen *et al.*, 2005). Deste modo, em solos em contacto com a rizosfera, as principais bactérias lácticas encontradas pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* e *Leuconostoc*, podendo ser encontradas espécies pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* (Chen *et al.*, 2005; Fhoula *et al.*, 2013).

1.5.3 Árvores

As árvores possuem uma diversidade microbiana elevada, associada quer aos troncos quer às folhas, podendo a população bacteriana das folhas ultrapassar as 10^{26} UFC (Delmotte *et al.*, 2009), e a população de leveduras dos troncos variar entre as 6 UFC e as 25 UFC, por grama de casca (Bhadra *et al.*, 2008). Porém, apesar de existirem diversos estudos focados na população bacteriana das árvores, não estão relatados isolamentos de bactérias acéticas e lácticas, neste ambiente.

Todavia, muitos estudos confirmam a presença de leveduras nas árvores, estando estas principalmente associadas aos seus exsudados (Spencer *et al.*, 1996). Neste ambiente, a maioria das leveduras são ascomicetas, podendo ser encontrados os gêneros *Pichia*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Hanseniaspora*, *Lodderomyces*, *Kodamaea*, *Metschnikowia* e *Torulaspora* (Spencer *et al.*, 1996; Bhadra *et al.*, 2008). De entre as basidiomicetas, as maioritariamente isoladas pertencem aos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Rhodospiridium* (Spencer *et al.*, 1996; Bhadra *et al.*, 2008). Assim, de entre os gêneros referidos é possível encontrar algumas leveduras associadas à produção e alteração do vinho, tais como *Debaryomyces hansenii* e *Torulaspora delbrueckii* (Spencer *et al.*, 1996; Bhadra *et al.*, 2008).

1.5.4 Videira

A videira (*Vitis vinifera*) é um reservatório natural de microrganismos que podem ser transferidos para as uvas e, na época da vindima, para a adega, podendo alguns destes afetar e comprometer a produção e qualidade do vinho (Pinto *et al.*, 2014). Assim, de entre as populações bacterianas presentes nas folhas de videira, é possível encontrar bactérias lácticas pertencentes aos gêneros *Leuconostoc* (*Ln. citreum* e *Ln. fallax*), *Enterococcus* (*E. italicus*), *Weissella* (*W. confuse*), *Lactobacillus* (*L. salivarius*), *Streptococcus* e *Lactococcus*; e bactérias acéticas pertencentes aos gêneros *Acidisoma*, *Gluconacetobacter* e *Roseomonas* (Pinto *et al.*, 2014). Contudo, a maioria destas bactérias não estão associadas ao processo de vinificação.

Quanto às leveduras, existem relatos do seu isolamento quer do tronco, quer das folhas de videira, não estando a maioria das leveduras relacionadas com o fabrico de vinho. No tronco, predominam as leveduras *Cryptococcus uniguttulatum*, *Candida zeylanoides* e *Rhodotorula* sp. (Sabate *et al.*, 2002); nas folhas, a maioria pertence aos géneros *Cryptococcus* (*Cr. laurentii*, *Cr. uniguttulatum* e *Cr. ater*), *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* e *Metschnikowia* (Sabate *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2014).

1.5.5 Adega

Como o ambiente de adega está associado à fermentação do sumo de uva, armazenamento, engarrafamento e envelhecimento de vinho, os microrganismos encontrados neste ambiente, podem ser uma fonte de contaminação durante estes processos (Ocón *et al.*, 2013a). Na adega, a disseminação microbiana pode ocorrer através das ferramentas, equipamentos, trabalhadores, insetos e também pelo ar (Garijo *et al.*, 2009; Ocón *et al.*, 2013a).

No ar das adegas, podem ser encontradas leveduras e bactérias lácticas, não estando relatados isolamentos de bactérias acéticas. Quanto às leveduras, o maior pico populacional ocorre durante a época de vinificação (Ocón *et al.*, 2013b), sendo os principais géneros descritos *Cryptococcus* (*Cr. carnescens*, *Cr. uzbekistanensis*, *Cr. magnus* e *Cr. diffluens*), *Candida* (*C. norvergica*, *C. pararugosa*, *C. parapsilosis* e *C. burtonii*), *Pichia* (*P. membranifaciens*, *P. farinosa* e *P. anomala*) e *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa* e *R. glutinis*), encontrando-se em menor concentração *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* (Ocón *et al.*, 2013a). Apesar das leveduras poderem ser encontradas durante todo o ano, no ar das adegas, Garijo *et al.* (2009) apenas conseguiram isolar bactérias lácticas (*Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Oenococcus oeni*) aquando da chegada das uvas à adega e durante a fermentação malolática.

No equipamento de adega, apenas está descrita a presença de leveduras, sendo os principais géneros encontrados *Cryptococcus* (*Cr. diffluens* e *Cr. laurentii*), *Candida* (*C. sorbosa*, *C. vinaria*, *C. intermedia*, *C. zeylanoides* e *C. wickerhamii*), *Pichia* (*P. anomala* e *P. membranifaciens*) e *Zygosaccharomyces* (*Z. veronae* e *Z. bailii*) (Sabate *et al.*, 2002; Ocón *et al.*, 2010). Em menor concentração, é também possível isolar *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Kloeckera apiculata* (Ocón *et al.*, 2010). Contudo, a principal levedura de contaminação dos vinhos, *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, nunca foi isolada do equipamento de adega, com exceção das cubas (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

1.6 Métodos de seleção e identificação de microrganismos

1.6.1 Meios de cultura

A escolha dos meios de cultura é uma das fases críticas no que toca à caracterização de populações microbianas complexas, como é o caso do consórcio microbiano do vinho, uma vez que meios de cultura gerais apenas selecionam os microrganismos mais frequentes e com maior taxa de

crescimento (Barata *et al.*, 2012a). Assim, a seleção de espécies minoritárias ou com taxas de crescimento baixas, como é o caso das espécies associadas ao vinho, requer a realização de uma etapa de enriquecimento, seguida de uma utilização de meios seletivos, que muitas das vezes se baseiam na utilização de antibióticos (Barata *et al.*, 2012a).

O DBDM (Dekkera/Brettanomyces *Differential Medium*), tal como o nome indica, é o meio mais utilizado para a seleção de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*, dada a sua elevada especificidade (Barata *et al.*, 2012a). A especificidade deste meio é garantida pela utilização de etanol como única fonte de carbono; pela inclusão de bromocresol verde capaz de evidenciar a presença de estirpes produtoras de ácidos; e pela presença de ácido p-cumárico, que ao ser utilizado como substrato para a produção de 4-etilfenol, confere ao meio um odor associado a este microrganismo (Rodrigues *et al.*, 2001).

Devido à utilização de apenas glucose e ácido fórmico como fontes de carbono e energia, o ZDM (*Zygosaccharomyces Differential Medium*) é o meio mais utilizado quando se pretende selecionar *Zygosaccharomyces bailii*, dado que apenas esta estirpe de leveduras é capaz de alcalinizar um meio com estas condições (Schuller *et al.*, 2000).

1.6.2 Fenotípicos

Os testes fenotípicos baseiam-se em características físicas e fisiológicas que possuem diferentes graus de semelhança entre microrganismos, permitindo, desta forma, uma identificação a nível do género e, por vezes, da espécie (Fugelsang e Edwards, 2007b). Assim, uma vez que estes microrganismos possuem características diferentes, existem testes distintos para a identificação de leveduras e bactérias.

1.6.2.1 Leveduras

Um dos testes fenotípicos mais utilizado na distinção de leveduras basidiomicetas, de leveduras ascomicetas é o teste *Christensen Urea Agar* (CUA), que se baseia na libertação de amónia durante a hidrólise da ureia, aumentando o pH do meio e convertendo o fenol *red* em rosa forte (Roberts *et al.*, 1978). Desta forma, o teste positivo, que indica a presença de uma levedura basidiomiceta, apresenta uma cor rosa; e o negativo, que assinala a presença de uma levedura ascomiceta, uma cor amarela (Roberts *et al.*, 1978). Contudo, algumas leveduras ascomicetas, como por exemplo as do género *Schizosaccharomyces*, são capazes de hidrolisar a ureia, originando um falso resultado (Kurtzman *et al.*, 2011). Desta forma, e visto que uma das principais características que distingue esta levedura é a reprodução por fissão, torna-se necessária uma observação microscópica, para a deteção de possíveis microrganismos pertencentes a este género (Fugelsang e Edwards, 2007c).

1.6.2.2 Bactérias

Para a distinção de bactérias, os testes mais utilizados são a coloração de Gram, o teste da catalase e o teste da oxidase.

O primeiro teste referido, a coloração de Gram, assenta na diferenciação de espécies através das características da parede celular, sendo a quantidade de peptidoglicanos existentes na parede a principal característica diferenciadora (Orsi *et al.*, 2004; Fugelsang e Edwards, 2007b). As bactérias Gram positivas, como as bactérias lácticas, possuem cerca de 90% de peptidoglicanos, enquanto a parede celular das bactérias Gram negativas, como as bactérias acéticas, possui apenas 10% (Orsi *et al.*, 2004). Assim, e devido à quantidade de peptidoglicanos existentes na parede, quando as bactérias Gram positivas são expostas ao descolorante, de forma a ser removido o cristal violeta, estas geram uma camada impermeável que bloqueia a difusão do cristal violeta, ao contrário do que acontece com as bactérias Gram negativas, que posteriormente se encontram aptas para absorver a safranina (Orsi *et al.*, 2004).

O teste da catalase baseia-se na capacidade de alguns microrganismos converterem peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água e oxigénio (Taylor e Achanzar, 1972). Tal verifica-se, pois este é um subproduto originado durante o crescimento de certas estirpes, e dado apresentar alguma toxicidade para certos microrganismos, estes têm a necessidade de possuir a enzima catalase, que remove o peróxido de hidrogénio à medida que este é formado (Fugelsang e Edwards, 2007b). Uma vez expostas a peróxido de hidrogénio, as bactérias lácticas não apresentam a formação de bolhas, ao contrário do que se sucede com algumas bactérias acéticas, o que indica a formação de oxigénio (Fugelsang e Edwards, 2007b). Todavia, as bactérias acéticas tanto podem ser catalase positivas como negativas, dado o seu fenótipo ser variável (Mas *et al.*, 2007).

A reação da oxidase baseia-se na capacidade de algumas bactérias oxidarem tetrametil-p-fenilenodiamina em indofenol, dado possuírem a enzima citocromo oxidase (Steel, 1961). Desta forma, torna-se possível distinguir bactérias oxidase negativas, como as bactérias acéticas e lácticas, de bactérias oxidase positivas, pois estas últimas, na presença de tetrametil-p-fenilenodiamina, produzem indofenol azul, indicando a presença da enzima, sendo a sua coloração visível a olho nu (Steel, 1961).

1.6.3 Moleculares

Os testes moleculares, nomeadamente as análises filogenéticas, baseiam-se em semelhanças e diferenças existentes no material genético, existindo atualmente diversos métodos, como os referidos posteriormente (Fugelsang e Edwards, 2007d).

1.6.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

O PCR é um dos métodos mais usado em biologia molecular, sendo utilizado para a amplificação de segmentos específicos de DNA através da enzima DNA-polimerase, responsável pela síntese de DNA (Watson *et al.*, 2004). Este método envolve três passos, replicados durante 25 a 40 ciclos, sendo o primeiro caracterizado pela desnaturação da cadeia dupla de DNA, através da ação da temperatura (90 - 96 °C). De seguida, dá-se uma redução da temperatura e ocorre a ligação dos *primers*, específicos para a região que se pretende replicar, formando-se, posteriormente, pela ação da DNA-polimerase, uma cadeia complementar. O terceiro e último passo ocorre, mais uma vez, pela

ação da enzima DNA-polimerase e é caracterizado pela replicação das cadeias complementares que, ao longo de cada ciclo, são sucessivamente amplificadas (Watson *et al.*, 2004; Fugelsang e Edwards, 2007d).

No entanto, como este método requer a utilização de uma vasta gama de temperaturas, que conseguem, rapidamente, desnaturar a maioria das enzimas, é necessário que seja utilizada uma enzima estável a elevadas temperaturas (Fugelsang e Edwards, 2007d). Deste modo, a enzima de eleição é, normalmente, a Taq-polimerase, uma vez que esta é obtida de uma bactéria termofílica (*Thermus aquaticus*), tendo por isso a sua temperatura ótima a cerca de 72°C sendo por isso resistente a altas temperaturas (Watson *et al.*, 2004).

Desta forma, esta técnica pode ser utilizada quando se pretende identificar microrganismos. Por exemplo, para se proceder à identificação de leveduras, o método de PCR mais usual baseia-se na análise de DNA ribossomal (rDNA), uma vez que este possui diversas regiões conservadas, como as correspondentes aos genes 5.8S, 18S e 26S (Fernández-Espinar *et al.*, 2011). Assim, uma das regiões mais utilizada para a identificação destes microrganismos é a região 5.8S e as suas regiões intergénicas adjacentes – ITS1 e ITS2 –, sendo amplificadas através da utilização dos *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Fernández-Espinar *et al.*, 2011).

Para a identificação de bactérias acéticas, o método mais comum envolve a região entre os genes ribossomais 16S e 23S, sendo, normalmente, amplificada a região intergénica associada ao último, uma vez que esta apresenta maior variabilidade que os genes ribossomais (Guillamón e Mas, 2011). No entanto, para a identificação de bactérias lácticas a região mais utilizada é a região 16S, dado que a região intergénica associada à região 23S se encontra menos preservada (Muñoz *et al.*, 2011).

1.6.3.2 Eletroforese

A eletroforese é um método utilizado na separação de moléculas de DNA ou RNA pela aplicação de um campo elétrico, através de uma matriz de gel de agarose capaz de separar as moléculas de acordo com o seu tamanho (Fugelsang e Edwards, 2007d). Tal acontece porque as moléculas de DNA possuem carga negativa e, quando submetidas a um campo elétrico, migram em direção ao polo positivo, de acordo com o seu tamanho. Isto é, os segmentos de maiores dimensões migram mais lentamente, devido ao seu maior volume efetivo e, consequentemente têm maior dificuldade em passar pelos interstícios do gel do que as moléculas de menores dimensões. Assim, após um período de migração pelo gel, moléculas de tamanhos diferentes podem ser observadas em diferentes locais de migração (Watson *et al.*, 2004).

1.6.3.3 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)

Esta técnica tem como objetivo a diferenciação de organismos através da análise de padrões resultantes da fragmentação de uma sequência específica do seu DNA, pela ação de endonucleases de restrição específica (Fugelsang e Edwards, 2007d). Desta forma, e através das semelhanças e

diferenças existentes nos padrões originados, é possível diferenciar gêneros, espécies e, por vezes, estirpes (Fugelsang e Edwards, 2007d).

1.6.3.4 Sequenciação

Em 1975, Sanger e Coulson descreveram o primeiro método de sequenciação de DNA, que, devido à sua ineficácia, teve de ser melhorado. Assim, em 1977, Sanger e os seus colegas descreveram um novo método, apelidado de método de terminação da cadeia (Figura 4), que permitia a sequenciação de oligonucleótidos via polimerização enzimática (Sanger *et al.*, 1977). Este novo método consistia numa reação enzimática capaz de polimerizar os fragmentos de DNA complementares ao molde do DNA desconhecido, através do emparelhamento de um oligonucleótido curto a uma região específica conhecida do DNA desconhecido, o que estimula a síntese de DNA. Desta forma, na presença das DNA-polimerases, ocorre a polimerização dos desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), originando-se DNA, terminando esta reação apenas quando se dá a ligação de um nucleosídeo modificado (ddNTP), chamado de terminador, à cadeia em formação. Após serem formados todos os fragmentos, estes são avaliados numa eletroforese em gel de poliácridamida, em condições desnaturantes, em quatro poços paralelos, sendo os resultados, posteriormente, analisados por autoradiografia (França *et al.*, 2002).

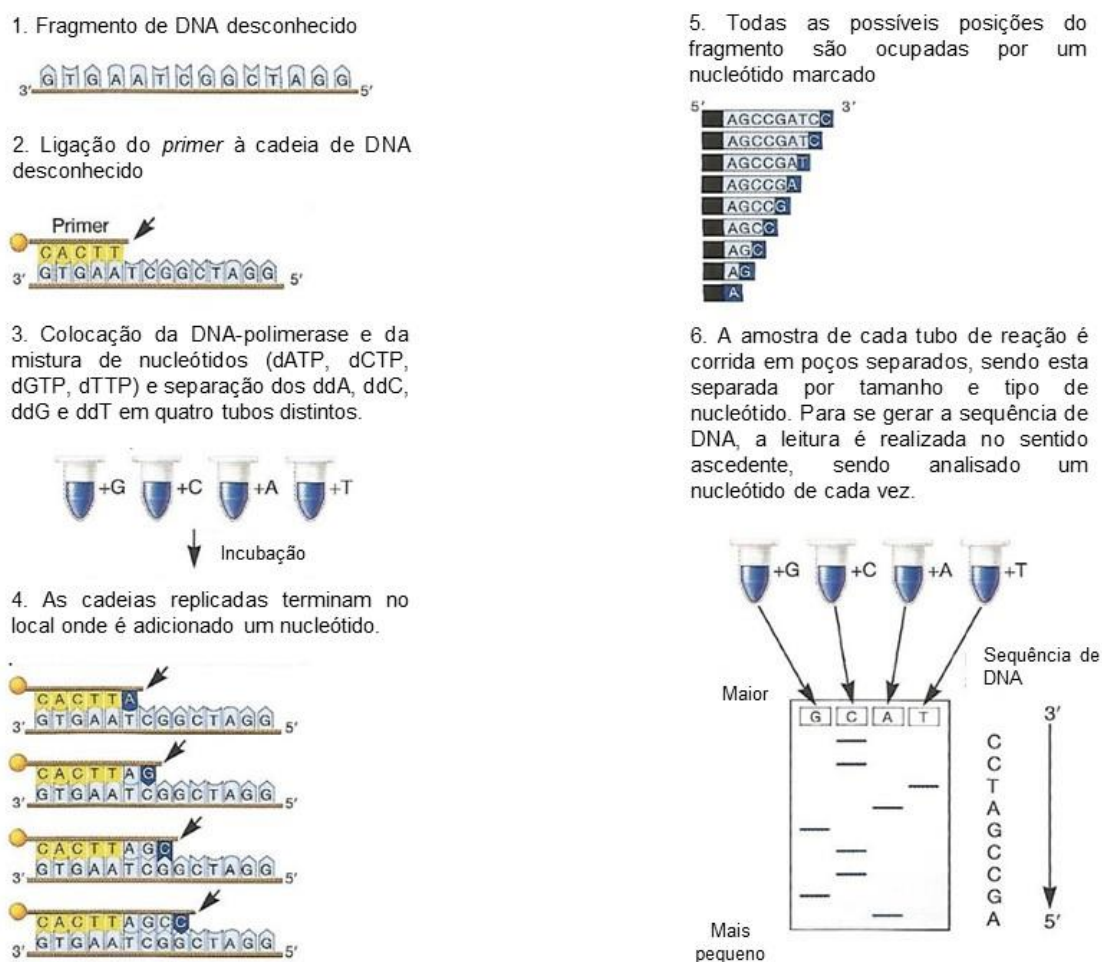


Figura 4 – Sequenciação de DNA pelo método de Sanger (Adaptado de Willey *et al.*, 2008b).

Existem, também, outros métodos de sequenciação de DNA, como o método de Maxam e Gilbert, que se baseia numa degradação química, e a pirosequenciação, isto é, a sequenciação de DNA em tempo real através da deteção de pirofosfato libertado (França *et al.*, 2002).

2. Materiais e Métodos

2.1 Recolha de amostras

De forma a abranger diversas fases fenológicas da videira, foram efetuadas recolhas de amostras, no inverno, no mês de fevereiro; na primavera, em maio; na fase do pintor, no mês de julho; e na altura da vindima, isto é, em setembro. Todas as recolhas foram efetuadas em diferentes locais do Instituto Superior de Agronomia (38°42'27.95" N, 9°10'56.34" O, elevação 51 m), Lisboa, Portugal, tal como está representado no Anexo 1 – Localização dos locais de recolha de amostras. Como se pode verificar, as amostras foram recolhidas em duas vinhas distintas, em zonas arbóreas perto de cada vinha e numa zona florestal distante das mesmas, sendo que esta última serviu para averiguar a comunidade microbiana longe da vinha.

2.1.1 Solos

A recolha de solos foi efetuada nas quatro épocas referidas acima e, tal como se pode observar no Anexo 1A, foram retiradas cinco amostras, sendo quatro delas das zonas de vinha e uma de uma zona florestal distante dos locais anteriores, da forma mais assética possível.

2.1.2 Troncos de árvores

A recolha de partes de troncos de árvores foi realizada nas quatro épocas mencionadas anteriormente, da maneira mais assética possível, e, como se pode observar no Anexo 1B, estas foram efetuadas em árvores próximas da zona de vinha, nomeadamente, num zambujeiro (*Olea europaea* var. *sylvestris* Mill.), num sobreiro (*Quercus suber* L.), num cipreste (*Cupressus sempervirens* L.) e num pitósporo (*Pittosporum tobira* Ait.); e num cipreste longe da vinha. Contudo na primavera, pintor e vindima foram também recolhidos troncos de videira, sendo estas amostras recolhidas de duas videiras distintas.

2.1.3 Insetos

Nas quatro épocas referidas foram colocadas cinco armadilhas cromotrópicas adesivas (Biosani, Portugal), de cor amarela, para insetos (20 cm x 25 cm), nos locais indicados no Anexo 1C, isto é, em quatro em videiras (*Vitis vinifera* L.) e num cipreste (*Cupressus sempervirens* L.) distante das zonas de vinha. As armadilhas foram deixadas durante seis dias, de forma a ser possível recolher uma vasta quantidade de insetos.

2.1.4 Folhas de videira

Na primavera, pintor e na época da vindima foram recolhidas cinco folhas de videira, da forma mais assética possível, dos locais indicados no Anexo 1D.

2.1.5 Uvas

Foram recolhidas amostras de uvas na época do pintor e da vindima, tendo sido coletadas apenas uvas sãs, na primeira época, e uvas sãs e danificadas, na segunda época. Os locais de recolha encontram-se mencionados no Anexo 1D.

2.1.6 Adega

A adega e respetivos equipamentos foram analisados em duas épocas distintas, isto é, durante o pintor e no decorrer da vindima. As amostras foram recolhidas das paredes, cubas, prensa, desengaçador e estabilizador, através da ajuda de uma zaragatoa.

2.1.7 Mosto

Na época da vindima foram recolhidos 250 mL de mosto de vinho tinto e de vinho branco, sem adição de fermentos.

2.2 Seleção de microrganismos

De modo a também ser possível isolar os microrganismos presentes em menor concentração cada amostra foi incubada em água peptonada (peptona [Biokar Diagnostics, França] 10 g.L⁻¹, cloreto de sódio [Merck, Alemanha] 5 g.L⁻¹), durante 24 horas, a 25 °C.

Posteriormente, as amostras foram inoculadas em meios seletivos para os distintos grupos de microrganismos. Para a pesquisa de leveduras foram utilizados os meios seletivos MYP (*Malt Yeast Peptone Agar*: extrato de malte [Biokar Diagnostics, França] 7 g.L⁻¹, extrato de levedura [Biokar Diagnostics, França] 0,5 g.L⁻¹, peptona de soja [Biokar Diagnostics, França] 2,5 g.L⁻¹, agar [Dário Correia, Portugal] 20 g.L⁻¹) e NSM (*No sulfate medium*: extracto de levedura 20 g L⁻¹, glucose 10 g L⁻¹ [Copam, Portugal], triptona [Biokar Diagnostics, França] 10 g L⁻¹, agar 22 g.L⁻¹, pH 5) a que foram adicionados, após esterilização, dois antibióticos, bifênil (Sigma-Aldrich, EUA) (0,08 g.L⁻¹) e cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EUA) (0,1 g.L⁻¹), de forma a inibir o crescimento de fungos filamentosos e bactérias, respetivamente. Todavia, para a pesquisa de leveduras da espécie *Zygosaccharomyces bailii*, usou-se meio seletivo ZDM (*Zygosaccharomyces Differential Medium*: solução 1 - sulfato de amónia [Merck, Alemanha] 5 g.L⁻¹, di-hidrogeno fosfato de amónia [Merck, Alemanha] 5 g.L⁻¹, sulfato de magnésio hepta-hidratado [Merck, Alemanha] 0,5 g.L⁻¹, cloreto de cálcio di-hidratado [Merck, Alemanha] 0,13 g.L⁻¹, verde de bromocresol [Sigma-Aldrich, EUA] 0,05 g.L⁻¹, água 800 mL, pH 4,5), a que foi adicionado uma segunda solução (glucose 1 g.L⁻¹, ácido fórmico [Merck, Alemanha] 4 mL, oligoelementos A 0,5 mL, oligoelementos B 0,5 mL, vitaminas 0,5 mL, água 200 mL), após esterilização. A solução de oligoelementos A, referida anteriormente, é composta por ácido bórico [Fluka, EUA] (1 g.L⁻¹), iodeto de potássio [Merck, Alemanha] (0,2 g.L⁻¹) e molibdato de sódio [Merck, Alemanha] (0,4 g.L⁻¹); a solução de oligoelementos B por sulfato de cobre [Merck, Alemanha] (0,08 g.L⁻¹), cloreto de ferro [Merck, Alemanha] (0,4 g.L⁻¹), sulfato de manganês [May & Baker, Reino Unido] (0,8 g.L⁻¹) e sulfato de zinco [Merck, Alemanha] (0,8 g.L⁻¹); e a solução de vitaminas por biotina [Sigma-Aldrich, EUA] (0,01 g.L⁻¹), pantotenato de cálcio [Merck, Alemanha] (0,8 g.L⁻¹), inositol [Mann Research Laboratories, EUA] (40 g.L⁻¹), niacina [Merck, Alemanha] (1,6 g.L⁻¹), piridoxina [Merck, Alemanha] (1,6 g.L⁻¹) e tiamina [Merck, Alemanha] (1,6 g.L⁻¹). Para isolar leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* foi utilizado o meio seletivo DBDM (*Dekkera/Brettanomyces Differential Medium*: solução 1 – verde de bromocresol 0,022 g.L⁻¹, água 800 mL, agar 22 g.L⁻¹,

pH 5,4), que foi adicionado de mais duas soluções (solução 2 - *yeast nitrogen base* [Difco, EUA] 6,7 g.L⁻¹, ciclohexamida [Sigma-Aldrich, EUA] 0,1 g.L⁻¹, cloranfenicol 0,1 g.L⁻¹, água 240 mL; solução 3 – ácido p-cumárico [Sigma-Aldrich, EUA] 0,1 g.L⁻¹, etanol 99% [Aga, Portugal] 60 ml), após esterilização. Os antibióticos utilizados neste meio, ciclohexamida e cloranfenicol, destinam-se à inibição de *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias, respetivamente.

Para selecionar bactérias lácticas utilizou-se o meio MRS (*De Man, Rogosa e Sharpe*: MRS [Biokar Diagnostics, França] 52 g.L⁻¹, agar 20 g.L⁻¹), a que foi acrescentado, após esterilização, L- cisteína (Merck, Alemanha) (0,1 g.L⁻¹) e bifenil (0,08 g.L⁻¹).

Para a seleção de bactérias acéticas, foi utilizado o meio GYC (*Glucose Yeast Extract-Carbonate*: glucose 5 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹, carbonato de cálcio [Merck, Alemanha] 3 g.L⁻¹, agar 20 g.L⁻¹), a que foi adicionado, após esterilização, bifenil(0,08 g.L⁻¹).

As condições de incubação foram diferentes para cada meio de cultura, sendo os meios MYP, NSM e ZDM colocados a 25 °C, durante cinco dias; o DBDM incubado a 25 °C, durante treze dias; e os meios MRS e GYC colocados a 30 °C, durante dois dias.

2.2.1 Solos

Para o isolamento dos microrganismos presentes no solo foram pesados aproximadamente 30 g de solo, posteriormente colocados em 250 mL de água peptonada. A solução obtida foi colocada durante 10 minutos num banho de ultrassons, para homogeneizar, e incubada a 25 °C. Após 24 horas de incubação, foram espalhados 100 µL, em placas de *petri* (Ø 90 mm), com os diferentes meios seletivos, com a ajuda de esferas de vidro (Ø 1 mm). Todas as placas obtidas foram incubadas nas condições supracitadas.

2.2.2 Insetos

Das armadilhas de cada local de captura foram selecionados, de forma aleatória, alguns insetos aparentemente distintos. De seguida, os insetos recolhidos foram colocados em 10 mL de água peptonada e deixados, durante cerca de 10 minutos, num banho de ultrassons. Posteriormente, a amostra foi incubada a 25°C durante 24 horas. Findo o tempo de incubação, foram espalhados 100 µL, nos diferentes meios, em placas de *Petri* (Ø 90 mm), com a ajuda de esferas de vidro (Ø 1 mm). Todas as placas obtidas foram incubadas nas condições referidas acima.

2.2.3 Troncos de árvores, folhas de videira e uvas

Para o isolamento dos microrganismos presentes nestas amostras, estas foram colocadas em 250 mL de água peptonada e submetidas a um banho de ultrassons, durante 10 minutos. De seguida, as soluções foram incubadas a 25 °C, durante 24 horas. Após o tempo de incubação, foram espalhados 100 µL de cada amostra, em placas de *petri* (Ø 90 mm), com os diferentes meios seletivos, com a ajuda de esferas de vidro (Ø 1 mm). Todas as placas obtidas foram incubadas nas condições mencionadas acima.

2.2.4 Adega

As zaragatoas utilizadas foram colocadas em 5 mL de água peptonada e submetidas a um banho de ultrassons durante 10 minutos. Posteriormente, foram colocadas durante 24 horas, numa estufa a 25 °C. Terminado o tempo de incubação foram espalhados 100 µL de cada amostra, em placas de *petri* (Ø 90 mm), com os diferentes meios seletivos, com o auxílio de esferas de vidro (Ø 1 mm). As placas obtidas foram incubadas nas condições referidas acima.

2.2.5 Mosto

De forma a isolar os microrganismos presentes no mosto foram realizados dois procedimentos distintos. No primeiro, foram inoculados 100 µL de mosto nos diferentes meios, sem enriquecimento prévio, com a ajuda de esferas de vidro (Ø 1 mm). O segundo procedimento iniciou-se com um enriquecimento de 24 h a 25 °C, sendo posteriormente inoculados 100 µL de mosto enriquecido nos diferentes meios, com a ajuda de esferas de vidro (Ø 1 mm). De seguida, as placas obtidas foram incubadas nas condições supracitadas.

Posteriormente, o mosto não enriquecido foi deixado a 25 °C, durante 10 dias. Findo o tempo de incubação foram inoculados 100 µL de mosto nos diferentes meios, com a ajuda de esferas de vidro (Ø 1 mm). De seguida, as placas obtidas foram incubadas nas condições supracitadas.

2.3 Purificação dos microrganismos

De forma a isolar os microrganismos obtidos, foram retiradas três a cinco colónias, da mesma ou das várias morfologias observáveis, sendo posteriormente riscadas em novas placas. De seguida, e de maneira a obter colónias isoladas, estas foram riscadas pelo menos cinco vezes, garantindo assim colónias puras, fundamentais para a sua posterior identificação. As colónias puras obtidas foram conservadas a -20°C, com os respetivos meios e 70% de glicerol.

2.4 Testes fenotípicos

2.4.1 Leveduras

2.4.1.1 Observação microscópica

Foi realizada uma observação microscópica de todas as leveduras isoladas, com o objetivo de identificar o seu modo de reprodução assexuada, isto é, fissão ou gemulação.

2.4.1.2 Hidrólise da ureia

Foi colocada biomassa das leveduras isoladas em 5 mL de meio CUA (peptona 1 g.L⁻¹, glucose 1 g.L⁻¹, cloreto de sódio [Merck, Alemanha] 2 g.L⁻¹, fenol red [May & Baker, Reino Unido] 12 mg.L⁻¹, ureia [Panreac, Espanha] a 20% 100 mL, pH 6,8), posteriormente incubado a 25 °C. Passados dois dias foi realizada a primeira observação e cinco dias depois foi confirmado o resultado.

Para este teste utilizou-se como controlo positivo a levedura basidiomiceta *Rhodosporidium toruloides* ISA 1854 e como controlo negativo a levedura ascomiceta *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

2.4.2 Bactérias

2.4.2.1 Coloração de Gram

Para a realização deste ensaio, foi realizado um esfregaço numa lâmina e, de seguida, foi realizada a fixação do mesmo, deixando-o secar ao ar e passando-o posteriormente pela chama, tendo cuidado para evitar o sobreaquecimento. O esfregaço fixado foi então coberto com cristal violeta (Merck, Alemanha), durante aproximadamente 30 segundos, sendo este depois decantado e removido o excesso com um fio de água. Após este passo, o esfregaço foi coberto com lugol (Difco, EUA), durante cerca de um minuto, e removido com água corrente. Seguidamente, a lâmina foi coberta com safranina (Merck, Alemanha), durante aproximadamente 30 segundos, tendo o cuidado de se remover o excesso com um fio de água. Após esta última lavagem, deixou-se secar o esfregaço corado, ao ar, e observou-se o resultado ao microscópio.

2.4.2.2 Teste da catalase

Foi colocada uma ansada de biomassa do isolado, numa gota de peróxido de hidrogénio (Continente, Portugal) e observado o resultado.

2.4.2.3 Teste da oxidase

Para este ensaio foram utilizadas tiras contendo hidraclorido de tetrametil-*p*-fenilenadamina (Liofilchem Diagnostici, Itália) que, em presença da enzima citocromo-oxidase, toma uma coloração azulada.

2.5 Métodos moleculares de diagnóstico

2.5.1 Ensaio preliminares

De forma a definir a concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂) utilizado nas amplificações de DNA abaixo descritas foi realizado um PCR com um gradiente de concentrações deste sal, isto é, 0 mM, 1 mM, 2 mM e 3 mM.

Para cada amplificação de DNA abaixo enumerada foi também ajustada a temperatura de emparelhamento, tendo por base as temperaturas de *melting* dos *primers* utilizados, sendo para isso realizados vários PCR's com diferentes temperaturas. Para a amplificação do DNA de leveduras foram testados os 48, 50 e 52 °C; para as bactérias lácticas foram experimentados os 47, 49, 50, 52 °C, para o PCR inicial das bactérias acéticas os 61, 64 e 65 °C, e para o *nested* PCR os 58, 60 e 62 °C.

2.5.2 Leveduras

2.5.2.1 Extração de DNA

As leveduras foram incubadas em meio NSM durante 48 h, a 25 °C. De seguida, foi colocada uma ansada de biomassa em 200 µl de água Milli-Q, posteriormente submetida a 96 °C, durante 10 minutos.

2.5.2.2 Amplificação de DNA

Para a identificação molecular, foi realizada uma amplificação de DNA numa mistura de PCR, utilizando os *primers* ITS1 (STABvida, Portugal) e ITS4 (STAvida, Portugal), descritos por White *et al.* (1990), com um volume total de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada *primer*, 1mM de MgCl₂ (nzytech, Portugal), 0.1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂ (nzytech, Portugal) e 1 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada num termociclador (Piko Thermal Cycler, Thermo Scientific, EUA), consistindo numa desnaturação inicial de 5 minutos, a 95 °C, seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 1 minuto, a 94 °C, um passo de emparelhamento de 2 minutos, a 50 °C, e um passo de extensão de 2 minutos, a 72 °C. A reação foi finalizada com uma extensão de 10 minutos, a 72 °C, sendo, posteriormente, realizado um arrefecimento até aos 4 °C. Como controlo positivo foi utilizada *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 e como controlo negativo usou-se *Lactobacillus plantarum* ISA 3960.

Os produtos de PCR foram observados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Seakem LE Agarose, Lonza, USA), em presença de tampão TBE (45 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, EUA), 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, EUA), pH 8). As amostras foram preparadas com 5 µL do produto de PCR, 2 µL de GelRed (Biotum, USA) e 2 µL de *loading dye* (NZYDNA, nzytech, Portugal). A corrida foi realizada durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 70 V. Finalmente, o gel foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc (BioRad, EUA), sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software Quantity One®.

2.5.2.3 Restrição do DNA amplificado

Para a restrição do DNA amplificado foram digeridos 10 µL do produto de PCR com as endonucleases de restrição HhaI (Thermo Scientific, EUA), HaeIII (Thermo Scientific, EUA) e HinfI (Thermo Scientific, EUA), durante 15 horas a 37 °C, como descrito em Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998. Os fragmentos de restrição obtidos foram separados em gel de agarose a 2,5%, em presença de tampão TBE, sendo a corrida realizada durante 50 minutos, a uma voltagem constante de 80 V. O gel obtido foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc, sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software QuantityOne®. Como controlo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

2.5.2.4 Sequenciação do DNA amplificado

O DNA amplificado foi sequenciado, pela STABvida (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma BLASTn.

2.5.3 Bactérias lácticas

2.5.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA de culturas puras, crescidas em meio MRS, durante 24 h, a 30 °C, foi realizada através do GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EUA).

2.5.3.2 Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada numa mistura de PCR, utilizando os *primers* PA (STABvida, Portugal) e PH (STABvida, Portugal), descritos por Edwards *et al.* (1989), com um volume total de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada *primer*, 1mM de MgCl₂, 0.1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂ e 1 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada num termociclador, consistindo numa desnaturação inicial de 5 minutos, a 94 °C, seguida de 30 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 30 segundos, a 94 °C, um passo de emparelhamento de 30 segundos, a 49°C, e um passo de extensão de 1 minuto, a 72 °C. A reação foi finalizada com uma extensão de 5 minutos, a 72 °C, sendo, posteriormente, realizado um arrefecimento até aos 4 °C. Foi utilizado como controlo positivo *Lactobacillus plantarum* ISA 3960 e como controlo negativo *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

Os produtos de PCR foram observados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em presença de tampão TBE. As amostras foram preparadas com 5 µL do produto de PCR, 2 µL de GelRed e 2 µL de *loading dye*. A corrida foi realizada durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 70 V. Finalmente, o gel foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc, sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software QuantityOne®.

2.5.3.3 Restrição do DNA amplificado

Para a restrição do DNA amplificado foram digeridos 10 µL do produto de PCR com as endonucleases de restrição Bfal (Thermo Scientific, EUA), MseI (Thermo Scientific, EUA) e AluI (Thermo Scientific, EUA), durante 15 h a 37 °C, como descrito em Rodas *et al.* (2003). Os fragmentos de restrição obtidos foram separados em gel de agarose a 3%, em presença de tampão TBE, sendo a corrida realizada durante 80 minutos, a uma voltagem constante de 70 V. O gel obtido foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc, sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software Quantity One®. Como controlo utilizou-se *Lactobacillus plantarum* ISA 1000.

2.5.3.4 Sequenciação do DNA amplificado

O DNA amplificado foi sequenciado, pela STABvida (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma BLAST.

2.5.4 Bactérias acéticas

2.5.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA de culturas puras, crescidas em meio GYC, durante 24 h, a 30 °C, foi realizada através do GeneJET Genomic DNA Purification Kit.

2.5.4.2 Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada numa mistura de PCR, utilizando os *primers* Ac1 (STABvida, Portugal) e Ac3 (STABvida, Portugal), descritos por Poblet *et al.* (2000), com um volume total de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada *primer*, 1mM de MgCl₂, 0.1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂ e 1 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada num termociclador, consistindo numa desnaturação inicial de 5 minutos, a 94 °C, seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 1 minuto, a 94 °C, um passo de emparelhamento de 2 minutos, a 64°C, e um passo de extensão de 2 minutos, a 72 °C. A reação foi finalizada com uma extensão de 10 minutos, a 72 °C, sendo, posteriormente, realizado um arrefecimento até aos 4 °C. Como controlo positivo utilizou-se *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409 e como controlo negativo usou-se *Escherichia coli* ISA 3967.

De seguida, e de forma a confirmar a identidade dos fragmentos de DNA, foi realizado um *nested* PCR, utilizando os *primers* AcA (STABvida, Portugal) e AcB (STABvida, Portugal), descritos em Poblet *et al.* (2000) com um volume total de de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada *primer*, 1mM de MgCl₂, 0.1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂ e 1 µL do produto do PCR anterior. A reação de PCR foi realizada num termociclador, consistindo numa desnaturação inicial de 5 minutos, a 94 °C, seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 1 minuto, a 94 °C, um passo de emparelhamento de 1 minuto, a 60°C, e um passo de extensão de 2 minutos, a 72 °C. A reação foi finalizada com uma extensão de 10 minutos, a 72 °C, sendo, posteriormente, realizado um arrefecimento até aos 4 °C.

Os produtos de PCR foram observados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,5%, em presença de tampão. As amostras foram preparadas com 5 µL do produto de PCR, 2 µL de GelRed e 2 µL de *loading dye*. A corrida foi realizada durante 70 minutos, a uma voltagem constante de 80 V. Finalmente, o gel foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc, sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software Quantity One®.

2.5.4.3 Restrição do DNA amplificado

Para a restrição do DNA amplificado foram digeridos 10 µL do produto de PCR com as endonucleases de restrição TaqI (Thermo Scientific, EUA), AluI (Thermo Scientific, EUA), CfoI (Thermo Scientific, EUA) e HaeIII (Thermo Scientific, EUA), durante 15 h a 37 °C, como referido em Poblet *et al.*, 2000. Os fragmentos de restrição obtidos foram separados em gel de agarose a 3%, em presença de tampão, sendo a corrida realizada durante 100 minutos, a uma voltagem constante de 60 V. O gel obtido foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc, sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software Quantity One®. Como controlo foi utilizada *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409.

2.5.4.4 Sequenciação do DNA amplificado

O DNA amplificado foi sequenciado, pela STABvida (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma BLAST.

3. Resultados e discussão

3.1 Ensaios preliminares de otimização da amplificação de DNA

3.1.1 Ajuste da concentração de cloreto de magnésio

O efeito de várias concentrações de cloreto de magnésio na amplificação do DNA está apresentado na Figura 5. Após terem sido efetuadas várias reações de PCR, com concentrações crescentes de $MgCl_2$, verificou-se que a concentração mínima para que ocorra amplificação de DNA, nas condições selecionadas, é de 1 mM. Esta concentração foi a utilizada em todas as amplificações utilizadas neste trabalho.

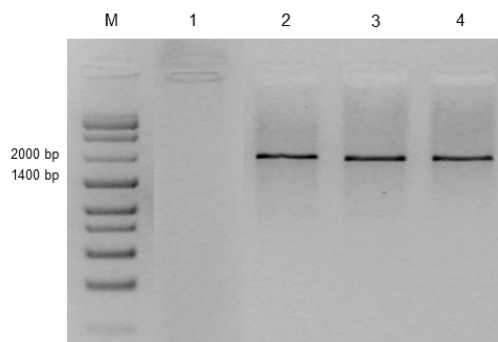


Figura 5 – Perfil eletroforético das diferentes concentrações de $MgCl_2$ testadas. M – NZYDNA Ladder VIII; 1 – 0 mM de $MgCl_2$; 2 – 1 mM de $MgCl_2$; 3 – 2 mM de $MgCl_2$; 4 – 3 mM de $MgCl_2$.

3.1.2 Ajuste da temperatura de emparelhamento

Após o ajuste da concentração de cloreto de magnésio foi necessário proceder ao ajuste da temperatura de emparelhamento para cada tipo de microrganismos, como mostrado em seguida.

3.1.2.1 Leveduras

Os perfis electroforéticos obtidos para as leveduras, com várias temperaturas de emparelhamento, estão apresentados na Figura 6. Como se pode observar, a uma temperatura de 48 °C (Figura 6A) ocorreram ligações inespecíficas, uma vez que os *primers* ligaram-se ao controlo negativo (*Lactobacillus plantarum* ISA 3960), enquanto que a uma temperatura de 52 °C (Figura 6B) não se verificou qualquer amplificação de DNA.

Desta forma, concluiu-se que a temperatura ótima de emparelhamento para os *primers* ITS1 e ITS4, nestas condições, foi de 50 °C (Figura 6C), uma vez que o controlo positivo apresenta amplificação e o controlo negativo não.

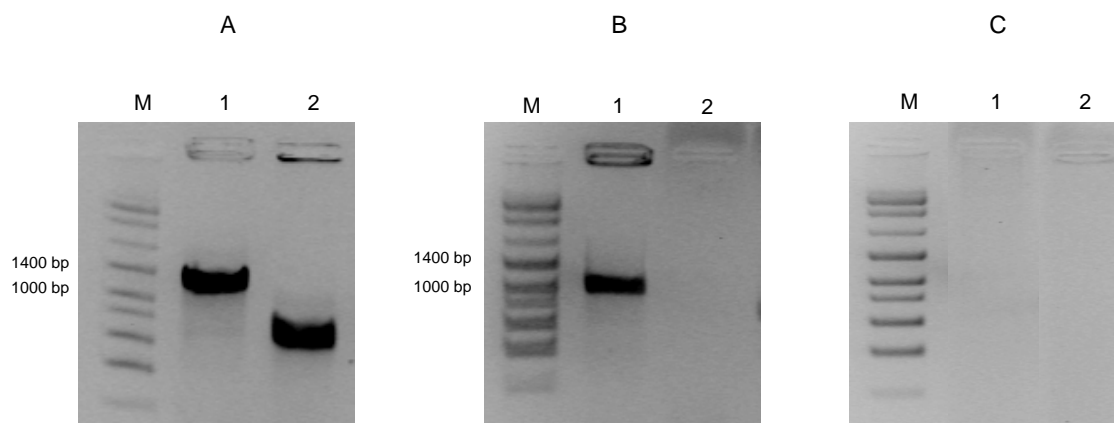


Figura 6 – Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers ITS1 e ITS4. (A) 48 °C: 1, *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000; 2, *Lactobacillus plantarum* ISA 3960. (B) 50 °C: 1, *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000; 2, *Lactobacillus plantarum* ISA 3960. (C) 52 °C: 1, *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000; 2, *Lactobacillus plantarum* ISA 3960. M – NZYDNA Ladder VIII.

3.1.2.2 Bactérias lácticas

Os perfis electroforéticos obtidos para as bactérias lácticas com várias temperaturas de emparelhamento encontram-se na Figura 7. Como se pode verificar, a temperatura ótima de emparelhamento dos primers PA e PH, nas condições selecionadas, foi de 49 °C, uma vez que a uma temperatura de 47 °C, ocorreram ligações pouco específicas, isto é, observou-se amplificação de DNA do controlo negativo (*Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000); e a temperaturas superiores à temperatura ótima, como por exemplo, a 50 °C, verificou-se uma diminuição da intensidade da banda e o aparecimento de uma banda adicional, provavelmente derivada de uma ligação inespecífica dos primers. A 52 °C, já não foi possível observar qualquer amplificação de DNA.

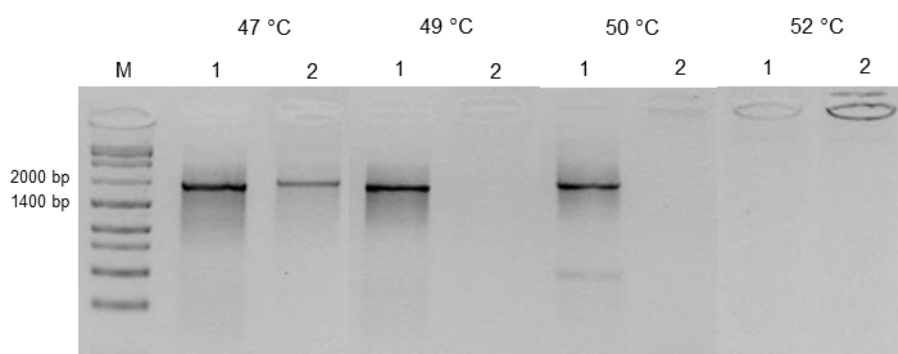


Figura 7 - Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers PA e PH. M – NZYDNA Ladder VIII; 1 - *Lactobacillus plantarum* ISA 3960; 2 - *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

3.1.2.3 Bactérias acéticas

Os perfis eletroforéticos obtidos para as bactérias acéticas, utilizando os *primers* Ac1 e Ac3 com várias temperaturas de emparelhamentos encontram-se apresentados na Figura 8. Assim, verificou-se que temperatura ótima de emparelhamento é de 64 °C, uma vez que a uma temperatura inferior (61 °C) ocorreram ligações pouco específicas, tendo-se verificado amplificação de DNA do controle negativo (*Escherichia coli* ISA 3967). A uma temperatura superior à temperatura ótima, não se observou uma amplificação de DNA satisfatória.

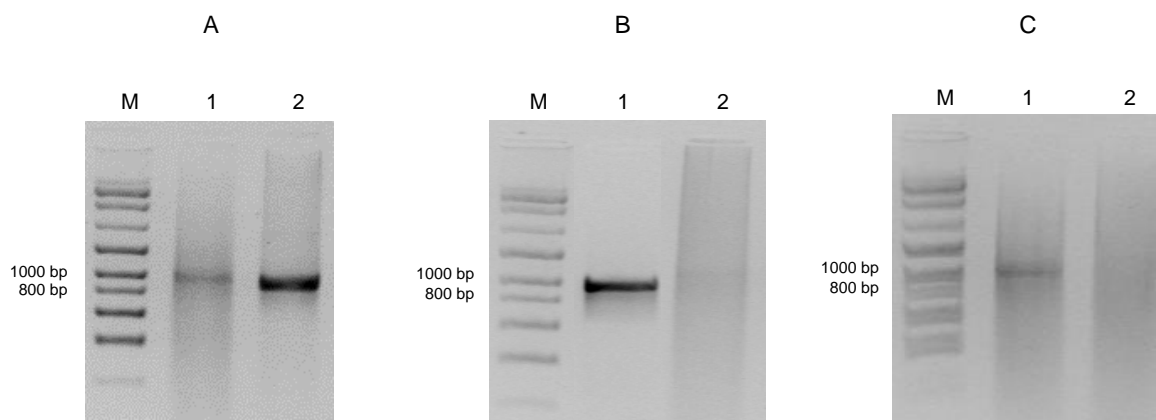


Figura 8 – Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os *primers* Ac1 e Ac3. (A) 61 °C: 1, *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2, *Escherichia coli* ISA 3967. (B) 64 °C: 1, *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2, *Escherichia coli* ISA 3967. (C) 65 °C: 1, *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2, *Escherichia coli* ISA 3967. M – NZYDNA Ladder VIII.

Em relação aos *primers* AcA e AcB do nested PCR, e como se pode observar na Figura 9, a uma temperatura de 58 °C, o DNA do controle positivo (*Acetobacter cerevisiae* ISA 4409) não foi totalmente amplificado. Contudo, a 60 °C verificou-se uma amplificação total do DNA de *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409, enquanto que o DNA do controle negativo (*Escherichia coli* ISA 3967) não sofreu qualquer amplificação, uma vez que a banda observada é proveniente do PCR anterior. A 62 °C não foi observada qualquer amplificação de DNA. Assim, pode concluir-se que a temperatura ótima de emparelhamento dos *primers* AcA e AcB é de 60 °C.

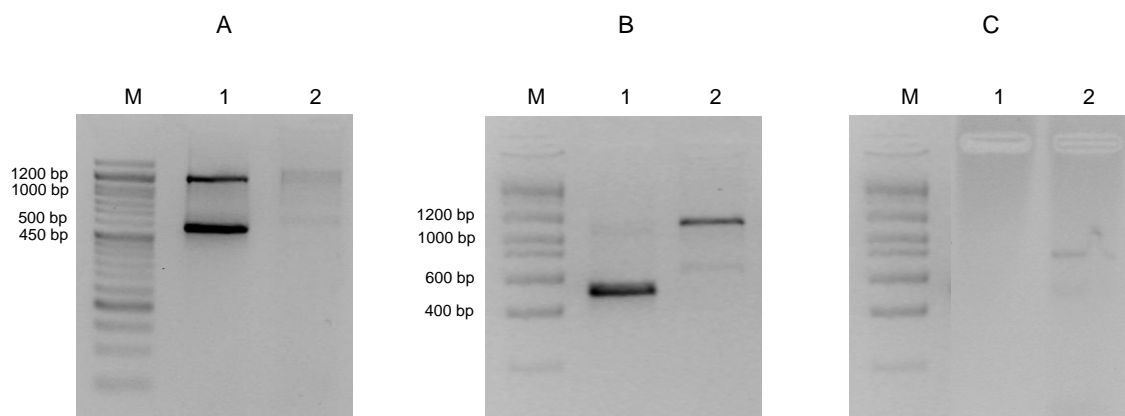


Figura 9 – Perfil eletroforético das temperaturas de emparelhamento testadas para os primers AcA e AcB. (A) 58 °C: 1, *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2, *Escherichia coli* ISA 3967. (B) 60 °C: 1, *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2, *Escherichia coli* ISA 3967. (C) 62 °C: 1, *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2, *Escherichia coli* ISA 3967. M – NZYDNA Ladder VIII.

3.2 Identificação de microrganismos isolados durante o inverno

No inverno foram isolados 240 microrganismos, sendo a maioria isolada do solo (38%), seguidos das árvores (35%) e dos insetos (28%) (Figura 10).

Em todos os locais analisados, as bactérias foram os principais microrganismos isolados, sendo que nas árvores o número de leveduras isoladas foi semelhante ao número de bactérias, ao contrário do que se verificou nos outros dois locais, em que o número de bactérias foi bastante superior. Este resultado pode dever-se à presença de exsudados, ricos em açúcar, facilitando o desenvolvimento de leveduras (Spencer *et al.*, 1996).

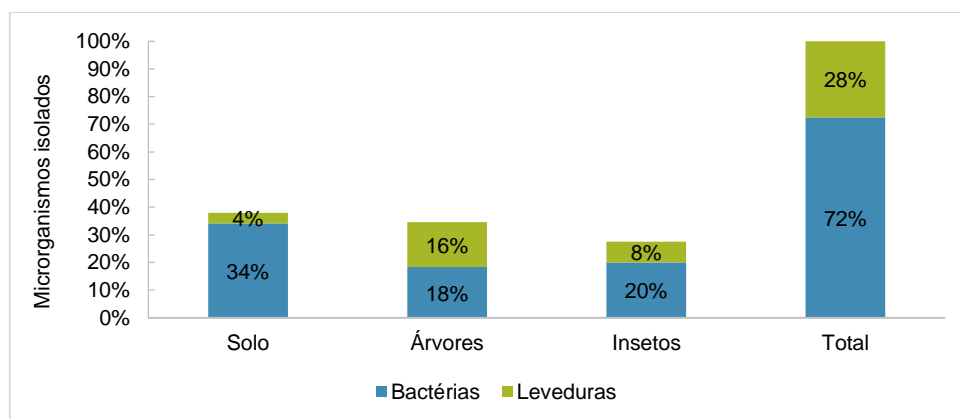


Figura 10 – Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados no inverno.

3.2.1 Leveduras

3.2.1.1 Testes fenotípicos

De acordo com o teste da urease, e como só as leveduras ascomicetas têm a capacidade de alterar o vinho ou contribuir para a sua produção, das 66 leveduras isoladas apenas 10 foram selecionadas para identificação, sendo 5 pertencentes às árvores e 5 aos insetos.

Assim, concluiu-se que no solo as leveduras basidiomicetas são as mais abundantes ou as únicas existentes e que nos outros locais estas leveduras, apesar de predominantes estão em menor quantidade. Porém, o resultado obtido para as árvores não corresponde ao relatado por Bhadra *et al.* (2008) que concluíram que, no inverno, os gêneros predominantes eram leveduras ascomicetas.

3.2.1.2 Identificação dos isolados

A região ITS das 10 leveduras ascomicetas isoladas foi amplificada com sucesso através da utilização dos *primers* ITS1 e ITS4, tendo-se obtido bandas com diferentes tamanhos, demonstrando uma elevada variedade de leveduras (Figura 11).

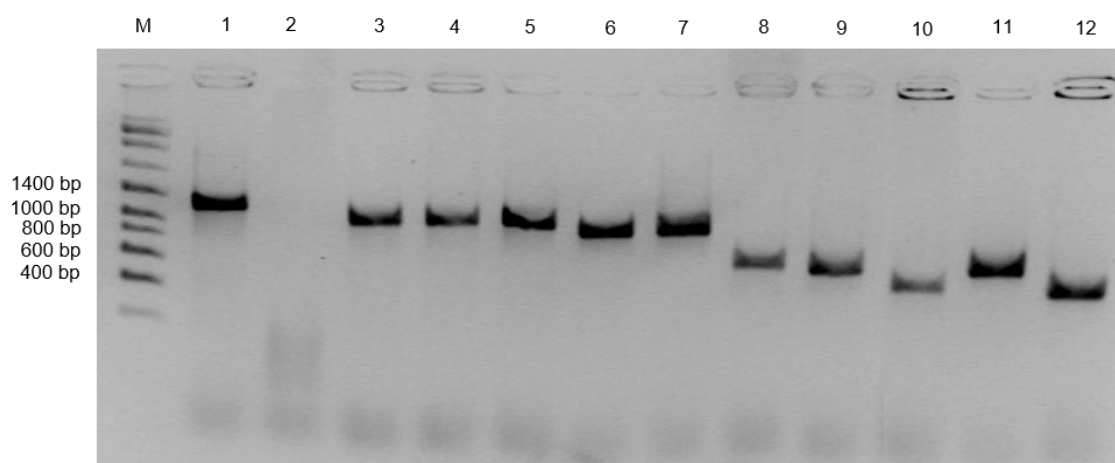


Figura 11 - Perfil eletroforético da amplificação do DNA das leveduras selecionadas para identificação, no inverno. M – NZYDNA Ladder VIII; 1 - *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000; 2 - *Lactobacillus plantarum* ISA 3960; 3 a 7 – Leveduras isoladas das árvores; 8 a 12 – Leveduras isoladas dos insetos.

Antes de se realizar uma restrição dos produtos de PCR obtidos anteriormente, e de maneira a verificar se os padrões de restrição estavam corretos, foi realizada uma restrição com duas leveduras conhecidas (Figura 12). Assim, verificou-se que, através dos padrões obtidos, era complicado proceder à identificação dos microrganismos, uma vez que os padrões não correspondiam exatamente aos citados na bibliografia. Desta forma, e como se tornava economicamente menos dispendioso, optou-se por proceder à sequenciação dos produtos de PCR dos isolados.

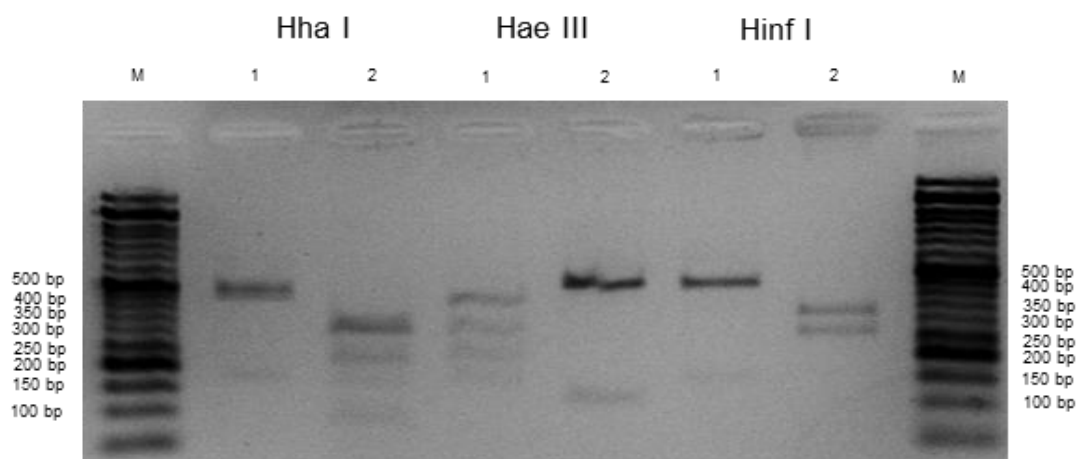


Figura 12 – Perfil eletroforético da restrição dos produtos de PCR de duas leveduras conhecidas. M – NZYDNA Ladder VI; 1 – *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000; 2 – *Dekkera bruxellensis* ISA 1791.

O resultado da sequenciação das leveduras ascomicetas isoladas encontra-se listado na Tabela 1. Nas árvores foram identificadas quatro leveduras da espécie *Debaryomyces hansenii* e uma pertencente à espécie *Debaryomyces robertesiae*, enquanto que nos insetos todas as ascomicetas pertenciam à espécie *Debaryomyces robertesiae*. Em relação às árvores, na mesma época do ano, Bhadra *et al.*, (2008) também isolaram, *Debaryomyces hansenii*, embora esta não tenha sido a espécie predominante.

Desta forma, pode concluir-se que durante esta época do ano apenas foi isolada uma espécie de levedura pertencente ao consórcio microbiano do vinho (*Debaryomyces hansenii*) (Renouf *et al.*, 2007), estando apenas presente nas árvores. É também de salientar que esta espécie se encontrava em 3 árvores distintas mas todas elas perto do ambiente da vinha.

Tabela 1 – Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação no inverno.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
WA80	<i>Debaryomyces robertesiae</i>	Cipreste ^a	WI78	<i>Debaryomyces robertesiae</i>	Inseto ^b
WA86	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Cipreste ^a	WI79		
WA87			WI83	<i>Debaryomyces robertesiae</i>	Inseto ^b
WA94	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Sobreiro ^a	WI87	<i>Debaryomyces robertesiae</i>	Inseto ^b
WA96	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Zambujeiro ^a	WI90	<i>Debaryomyces robertesiae</i>	Inseto ^b

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Isolado da zona de vinha

3.2.2 Bactérias

3.2.2.1 Testes fenotípicos

Em concordância com os resultados dos testes fenotípicos realizados, das 174 bactérias isoladas foram selecionadas para identificação apenas 70, sendo 35 oriundas do solo, 21 das árvores e 14 dos insetos. Todas as bactérias selecionadas para identificação eram possíveis bactérias acéticas, devido ao facto de serem Gram negativas, catalase positivas ou negativas e oxidase negativas. Desta forma, verificou-se uma ausência ou um número pouco significativo de bactérias lácticas nesta época do ano.

3.2.2.2 Identificação dos isolados

Como se pode observar na Figura 13, da amplificação de DNA com os *primers* Ac1 e Ac3 apenas resultou uma banda com aproximadamente 1000 bp (Figura 13). De forma a confirmar a identidade dos produtos de PCR foi realizado um *nested* PCR (Figura 14), com os *primers* AcA e AcB, no qual foram amplificados os produtos de PCR obtidos anteriormente. Desta amplificação resultou uma banda com aproximadamente 550 bp, no caso de possíveis bactérias acéticas (Figura 14 - 1) ou uma banda, com cerca de 1000 bp, caso a bactéria em questão não fosse acética (Figura 14 - 2). Assim, foram selecionadas para sequenciação, apenas 33 das 70 bactérias elegidas para identificação. Destas 33 bactérias, 21 pertenciam ao solo, 6 às árvores e 6 aos insetos.

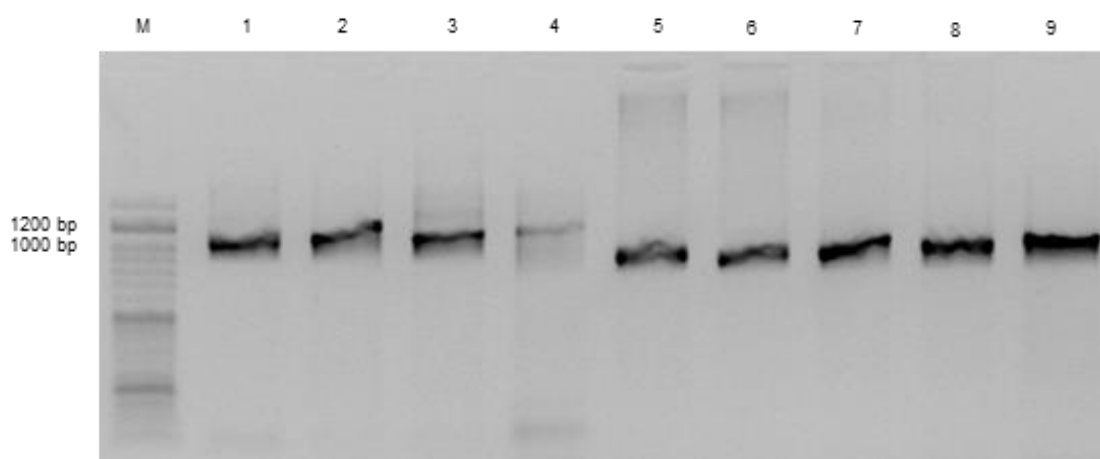


Figura 13 - Perfil eletroforético da amplificação do DNA, com os *primers* Ac1 e Ac3, das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação, no inverno. M – NZYDNA Ladder VI; 1 - *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2 - *Escherichia coli* ISA 3967; 3 a 9 - Bactérias isoladas dos solos.

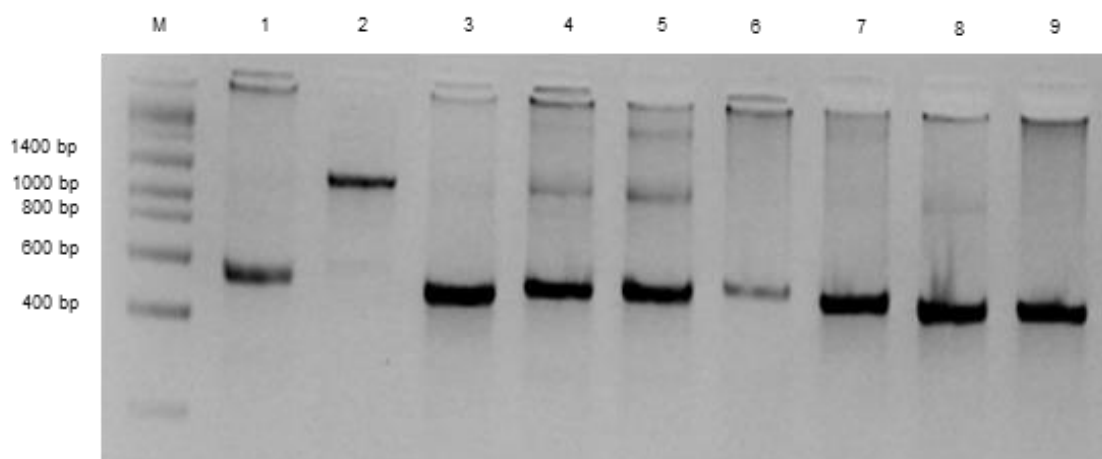


Figura 14 - Perfil eletroforético do nested PCR, com os primers AcA e AcB, das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação, no inverno. M - Marcador de peso molecular; 1 - *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409; 2 - *Escherichia coli* ISA 3967; 3 a 9 - Bactérias isoladas dos solos.

Tal como se procedeu para as leveduras, foi também realizada uma restrição dos produtos de PCR obtidos (dados não apresentados). Contudo, verificou-se que com os padrões resultantes, a identificação dos microrganismos era pouco fiável, uma vez que estes não correspondiam exatamente aos referidos na bibliografia. Para uma identificação mais precisa, e uma vez que se tornaria mais económico, optou-se por recorrer à sequenciação dos produtos de PCR.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da sequenciação das bactérias selecionadas para identificação. Como tal, pode verificar-se que das 21 bactérias do solo somente duas das espécies encontradas não pertenciam à família *Acetobacteraceae* – *Ensifer adhaerens* e *Flavobacterium pectinovorum*. Neste reservatório foram maioritariamente encontrados os géneros *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*. Assim, a existência de um elevado número de bactérias acéticas pode dever-se à presença de restos de uvas no solo, ou de uma melhor adaptação ao ambiente neste período do ano.

Nas árvores constatou-se que das 6 bactérias sequenciadas metade pertenciam à família *Acetobacteraceae*, sendo *Gluconobacter* o género mais isolado.

Contudo, nos insetos nenhuma das bactérias enviadas para sequenciação pertencia à família *Acetobacteraceae*.

Em suma, no inverno apenas foram isoladas três espécies de bactérias acéticas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho – *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter liquefaciens* e *Acetobacter tropicalis* (Joyeux *et al.*, 1984; Du Toit e Lambrechts, 2002; Sylhavi e Mandl, 2006) -, estando a primeira presente quer no solo quer nas árvores, e a segunda e terceira apenas no solo. Com estes resultados concluiu-se também que as bactérias acéticas estão disseminadas por diversos locais, mesmo em ambientes isolados da vinha.

Tabela 2 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação no inverno.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
Bactérias Acéticas			WS108	<i>Gluconacetobacter asukensis</i>	Solo ^b
WS55	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a	WS109	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a
WS70	<i>Gluconacetobacter asukensis</i>	Solo ^a	WA8	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Zambuheiro ^a
WS76	<i>Gluconacetobacter asukensis</i>	Solo ^a	WA24	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Cipreste ^b
WS77	<i>Acetobacter tropicalis</i>	Solo ^a	WA35	<i>Roseomonas cervicalis</i>	Cipreste ^a
WS79	<i>Gluconacetobacter asukensis</i>	Solo ^a	Outras bactérias		
WS80	<i>Gluconacetobacter asukensis</i>	Solo ^a	WS57	<i>Ensifer adhaerens</i>	Solo ^a
WS84	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a	WS94	<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	Solo ^a
WS89	<i>Gluconacetobacter asukensis</i>	Solo ^a	WA7	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	Zambuheiro ^a
WS91			WA15	<i>Pantoea</i> sp.	Pitósporo ^a
WS92	<i>Acidisphaera rubrificiens</i>	Solo ^a	WA17	<i>Chryseobacterium</i> sp	Pitósporo ^a
WS96	<i>Rhodopila globiformis</i>	Solo ^a	WI13	<i>Serratia marcescens</i>	Inseto ^c
WS97			WI14		
WS98	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a	WI17	<i>Serratia marcescens</i>	Inseto ^c
WS99			WI19		
WS101	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a	WI21	<i>Pseudomonas</i> sp.	Inseto ^c
WS103	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	Solo ^a	WI22		
WS105	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	Solo ^a			

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Reservatório localizado fora do ambiente de vinha

^c Isolado do ambiente de vinha

3.3 Identificação de microrganismos isolados durante a primavera

Na primavera foram isolados 316 microrganismos, sendo 42% isolados de insetos, 26% de árvores, 19% dos solos e 13% de folhas de videira (Figura 15).

Tal como no inverno, as bactérias foram os principais microrganismos isolados no solo, árvores e folhas de videira. Todavia, nos insetos, as leveduras foram os microrganismos maioritariamente isolados, embora o número de bactérias isoladas tenha sido bastante semelhante. O aumento do número de leveduras nos insetos, nesta época do ano, em relação ao inverno, pode dever-se ao início da floração, havendo aumento do consumo de néctar, rico em leveduras (Ganter, 2006).

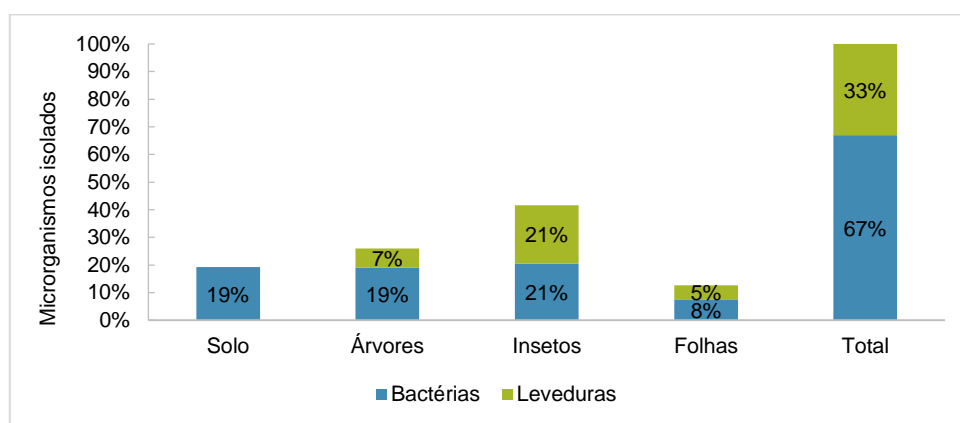


Figura 15 – Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados na primavera.

3.3.1 Leveduras

3.3.1.1 Testes fenotípicos

Das 106 leveduras isoladas nesta época apenas 12 foram selecionadas para identificação, sendo todas elas pertencentes aos insetos.

Desta forma, concluiu-se que nesta época do ano apenas existiam leveduras basidiomicetas ou estas estavam em grande maioria nas árvores e folhas de videira, enquanto que nos solos não foi encontrada qualquer levedura. A inexistência de leveduras nos solos ou a sua existência em número muito reduzido pôde dever-se à ausência de restos de uvas nos solos, aquando da recolha de amostras ou à preferência noutros reservatórios que sejam nutritivamente mais favoráveis nesta altura do ano.

3.3.1.2 Identificação dos isolados

Tal como no inverno, a região ITS dos 12 isolados foi amplificada com sucesso, tendo-se obtido bandas com diversos tamanhos, o que se deve à presença de diferentes espécies de leveduras (dados não apresentados).

Através da Tabela 3, pode verificar-se que a maioria das leveduras identificadas pertence ao género *Candida* – *Candida cellae* e *Candida parapsilopsis*, sendo a primeira a espécie mais encontrada.

Porém, foram também isoladas ascomicetas pertencentes ao género *Metschnikowia* – *Metschnikowia chrysoperlae*, embora este género só tenha sido encontrado em insetos isolados fora do ambiente de vinha.

Em conclusão, na primavera, apenas foi isolada uma espécie de levedura pertencente ao consórcio microbiano do vinho (*Candida parapsilopsis*) (González *et al.*, 2006), tendo sido encontrada em insetos capturados no ambiente de vinha e fora do mesmo.

Tabela 3 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na primavera.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
SI121	<i>Candida cellae</i>	Inseto ^a	SI166	<i>Candida parapsilopsis</i>	Inseto ^a
SI129	<i>Candida cellae</i>	Inseto ^a	SI167	<i>Candida cellae</i>	Inseto ^a
SI138	<i>Metschnikowia</i> sp.	Inseto ^b	SI171	<i>Candida cellae</i>	Inseto ^a
SI139	<i>Candida parapsilopsis</i>	Inseto ^b	SI173	<i>Candida parapsilopsis</i>	Inseto ^a
SI142	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	Inseto ^b	SI176	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	Inseto ^b
SI156	<i>Candida parapsilopsis</i>	Inseto ^a	SI188	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	Inseto ^b

^a Isolado do ambiente de vinha

^b Isolado fora do ambiente de vinha

3.3.2 Bactérias

3.3.2.1 Testes fenotípicos

Tendo em conta os resultados dos testes fenotípicos realizados, das 210 bactérias isoladas foram selecionadas para identificação apenas 33, sendo 8 oriundas do solo, 4 das árvores, 8 dos insetos e 13 das folhas de videira. Destas bactérias, 10 poderiam ser bactérias lácticas, uma vez que eram Gram positivas e catalase e oxidase negativas; e 23 eram supostas bactérias acéticas, visto que eram Gram negativas, oxidase negativas e catalase positivas ou negativas.

3.3.2.2 Identificação dos isolados

Para as possíveis bactérias acéticas, foi realizada uma amplificação de DNA com os *primers* Ac1 e Ac3 da qual resultou uma banda com aproximadamente 1000 bp (dados não apresentados). De forma a confirmar a identidade dos produtos de PCR obtidos anteriormente foi realizado um *nested* PCR, com os *primers* AcA e AcB, do qual também só resultou uma banda com cerca de 1000 bp (dados não apresentados). Estes resultados demonstram a inexistência de bactérias acéticas ou o seu número muito reduzido e, por isso não isoladas, nos reservatórios analisados na primavera.

Ao contrário do que se verificou no inverno, não foram encontradas bactérias acéticas nesta época do ano, nem nos solos nem nas árvores. A ausência destas bactérias nos solos pode ter como causa a inexistência de uvas, neste ambiente, aquando das recolhas, ou a sua era concentração demasiado baixa para que se conseguisse isolar.

Para as bactérias lácticas foi realizada uma amplificação de DNA com os *primers* PA e PH da qual se obteve uma banda com aproximadamente 1800 bp (Figura 16).

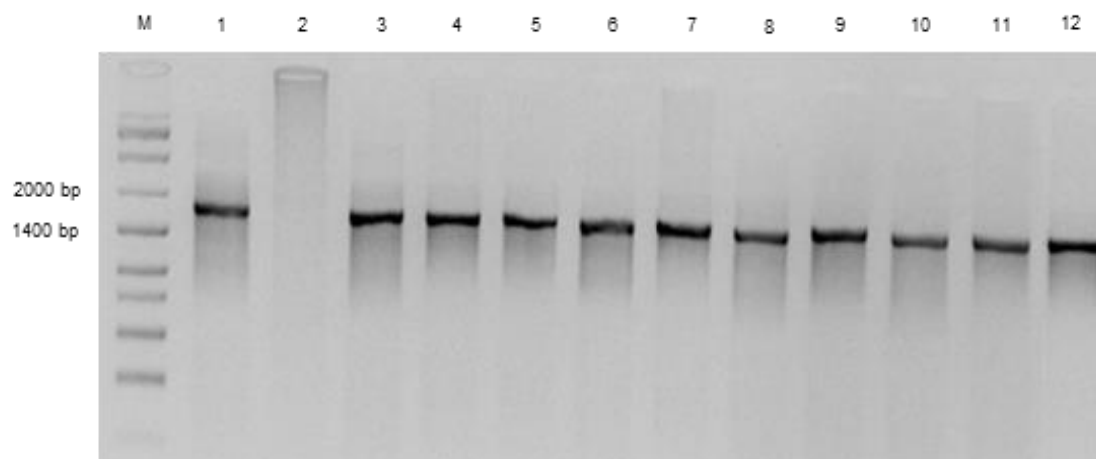


Figura 16 - Perfil eletroforético da amplificação do DNA das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na primavera. M – NZYDNA Ladder VIII; 1 - *Lactobacillus plantarum* ISA; 2 - *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000; 3 – Bactéria isolada do solo; 4 a 6 – Bactérias isoladas das árvores; 7 a 8, Bactérias isoladas dos insetos; 9 a 12, Bactérias isoladas das folhas de videira.

Tal como se procedeu para as leveduras e bactérias acéticas, foi também realizada uma restrição dos produtos de PCR obtidos (dados não apresentados). Mais uma vez, verificou-se que com os padrões resultantes a identificação dos microrganismos era pouco fiável, uma vez que estes não correspondiam exatamente aos mencionados na bibliografia. Desta forma, para uma identificação mais precisa, e uma vez que se tornaria mais económico, optou-se por recorrer à sequenciação dos produtos de PCR.

Através da observação da Tabela 4 pode concluir-se que a maioria dos isolados selecionados para identificação pertencem a géneros de bactérias lácticas – *Lactococcus* e *Enterococcus*. A maioria dos isolados é então pertencente ao primeiro género referido, sendo *Lactococcus lactis* a espécie mais encontrada. Ao contrário do que se verificou no inverno, foram isoladas, dos reservatórios analisados, bactérias lácticas, talvez devido a um aumento das temperaturas.

Foram também isoladas, apenas de árvores, bactérias pertencentes ao género *Bacillus*, nomeadamente *Bacillus cereus*.

Assim, pode concluir-se que, tal como no inverno, não foram encontradas bactérias lácticas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho apesar do número de bactérias lácticas ter aumentado em relação ao Inverno.

Tabela 4 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na primavera.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
Bactérias lácticas			SF10		
SS4	<i>Enterococcus faecium</i>	Solo ^a	SF11	<i>Lactococcus lactis</i>	Folha de videira
SA12	<i>Enterococcus</i> sp.	Pitósporo ^a	SF12		
SI66	<i>Lactococcus lactis</i>	Inseto ^b	Outras bactérias		
SI76	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inseto ^c	SA3	<i>Bacillus</i> sp.	Sobreiro ^a
SF9	<i>Lactococcus lactis</i>	Folha de videira	SA11	<i>Bacillus cereus</i>	Pitósporo ^a

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Isolado do ambiente de vinha

^c Isolado fora do ambiente de vinha

3.4 Identificação de microrganismos isolados durante o verão, na época do pintor

Na época do pintor foram isolados 422 microrganismos, sendo os insetos o reservatório que mais contribuiu para os isolamentos (31%), como se pode observar na Figura 17. Aos insetos seguiu-se o solo com 18% dos isolados, as árvores com 17%, as uvas com 16%, as folhas de videira com 10% e, por último, a adega e seus equipamentos com 9%.

Tal como se verificou no inverno e na primavera, as bactérias foram os principais microrganismos isolados no solo, nas árvores, nos insetos, nas uvas e na adega. Contudo, nas folhas de videira a quantidade de bactérias e de leveduras isoladas foi igual. A baixa percentagem de isolamentos na adega deve-se, possivelmente, ao facto de os equipamentos serem completamente novos.

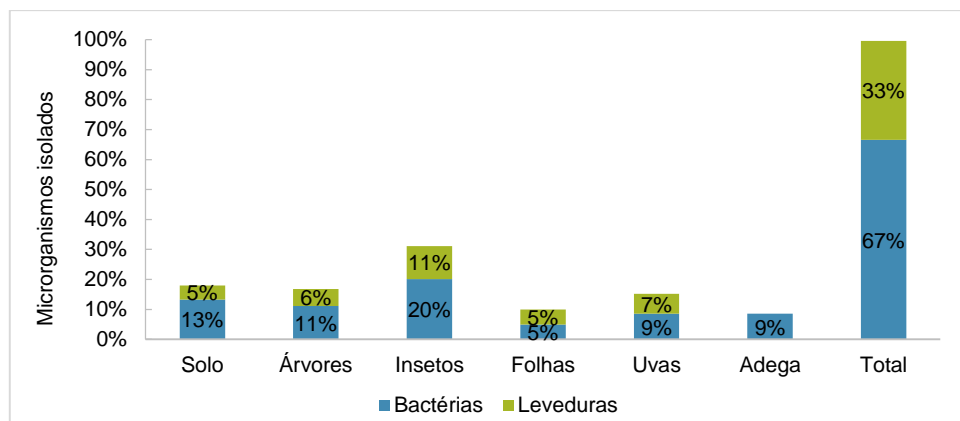


Figura 17 - Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados no verão, na época do pintor.

3.4.1 Leveduras

3.4.1.1 Testes fenotípicos

Conforme o observado nas duas épocas mencionadas anteriormente, também na época do pintor se verificou que, das 141 leveduras recolhidas, a maioria era basidiomiceta. Assim, apenas foram selecionadas 13 leveduras para identificação, tendo 3 isoladas nas árvores e 10 em insetos.

Tanto no solo, como nas folhas de videira e nas uvas, apenas existiam leveduras basidiomicetas. Quanto às uvas, Setati *et al.* (2012) concluíram também que na época do pintor existia uma maior quantidade de basidiomicetas em detrimento de ascomicetas, devido a uma menor concentração de açúcar.

Nas árvores e insetos, apesar de as leveduras basidiomicetas serem as dominantes, também existiam ascomicetas. Porém, a inexistência de ascomicetas nas folhas de videira não se encontra de acordo com o descrito por Pinto *et al.* (2014), que na altura do pintor isolaram mais leveduras ascomicetas que basidiomicetas.

Todavia, não foi isolada qualquer levedura da adega nem do seu equipamento, possivelmente pela adega ser nova.

3.4.1.2 Identificação dos isolados

A região ITS dos 13 isolados foi, mais uma vez, amplificada com sucesso, tendo-se obtido bandas com diversos tamanhos, devido à presença de distintas espécies de leveduras (dados não apresentados).

Na Tabela 5 encontram-se representados os resultados da sequenciação das ascomicetas isoladas na época do pintor, sendo possível verificar que foram isolados três géneros: *Debaryomyces*, *Metschnikowia* e *Candida*. O primeiro género referido foi isolado apenas de árvores, tal como observado no inverno, tendo-se encontrado duas espécies *Debaryomyces hansenii* e *Debaryomyces fabryi*, ambas num cipreste localizado na zona de vinha.

As 10 leveduras isoladas dos insetos pertenciam ao género *Metschnikowia* e *Candida*, tendo o segundo sido o género mais isolado. Desta forma, as espécies encontradas foram *Metschnikowia reukaufii*, *Candida albicans*, *Candida hawaiiiana* e *Candida apicola*.

Pode então concluir-se que na época do pintor foram isoladas duas espécies de leveduras pertencentes ao consórcio microbiano do vinho – *Candida apicola* e *Debaryomyces hansenii* (González *et al.*, 2006; Renouf *et al.*, 2007).

Tabela 5 – Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação, na época do pintor.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
PA33	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Cipreste ^a	PI111	<i>Candida hawaiiiana</i>	Inseto ^b
PA35			PI116	<i>Candida hawaiiiana</i>	Inseto ^b
PA81	<i>Debaryomyces fabryi</i>	Cipreste ^a	PI130	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Inseto ^b
PI104	<i>Metschnikowia</i> sp.	Inseto ^b	PI132	<i>Candida apicola</i>	Inseto ^b
PI106	<i>Candida albicans</i>	Inseto ^b	PI134	<i>Candida albicans</i>	Inseto ^b
PI107			PI135		
PI108					

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Isolado do ambiente de vinha

3.4.2 Bactérias

3.4.2.1 Testes fenotípicos

De acordo com os resultados dos testes fenotípicos realizados, das 281 bactérias isoladas foram selecionadas para identificação apenas 71, sendo 16 provenientes do solo, 15 das árvores, 27 dos insetos, 9 das folhas de videira e 4 das uvas. Destas bactérias, 18 eventualmente seriam bactérias lácticas, uma vez que eram Gram positivas e catalase e oxidase negativas, e 53 poderiam ser bactérias acéticas, visto que eram Gram negativas, oxidase negativas e catalase positivas ou negativas.

3.4.2.2 Identificação dos isolados

Para as 53 possíveis bactérias acéticas, foi efetuada uma amplificação de DNA com os *primers* Ac1 e Ac3 da qual se obteve uma banda com aproximadamente 1000 bp (dados não apresentados). De forma a confirmar a identidade dos produtos de PCR obtidos anteriormente foi realizado um *nested* PCR, com os *primers* AcA e AcB. Deste PCR 28 bactérias apresentaram uma banda com cerca de 1000 bp e 25 mostraram uma banda com aproximadamente 550 bp, tamanho esperado para as

bactérias acéticas (dados não apresentados). Desta forma, foram selecionadas para sequenciação apenas 25 bactérias.

Contudo, ao contrário do que se verificou no inverno, e tal como se observou na primavera, não foram encontradas bactérias acéticas em nenhum dos reservatórios analisados, como se pode observar na Tabela 6.

Mais uma vez, a ausência de bactérias acéticas no solo pode dever-se à inexistência de uvas no mesmo aquando da recolha de amostras, ou à sua concentração demasiado baixa para que se conseguisse isolar.

Tabela 6 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação na época do pintor.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
Outras bactérias			PA11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Pitósporo ^a
PS30	<i>Serratia ficaria</i>	Solo ^a	PA12	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Pitósporo ^a
PS31	<i>Enterobacter sp.</i>	Solo ^a	PA13	<i>Escherichia vulneris</i>	Zambujeiro ^a
PS33	<i>Serratia ficaria</i>	Solo ^a	PA18	<i>Escherichia hermannii</i>	Videira
PS38	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Solo ^a	PA24	<i>Enterobacter cloacae</i>	Cipreste ^b
PS41	<i>Serratia ficaria</i>	Solo ^a	PA64	<i>Cronobacter pulveris</i>	Videira
PS42	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Solo ^a	PA70	<i>Escherichia vulneris</i>	Cipreste ^b
PS52	<i>Raoultella terrigena</i>	Solo ^b	PF16	<i>Pantoea agglomerans</i>	Folha de videira
PS54			PU18	<i>Enterobacter absuriae</i>	Uva
PS55	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Solo ^b	PU21	<i>Pantoea sp.</i>	Uva
PA4	<i>Raoultella terrigena</i>	Sobreiro ^a	PU32	<i>Pantoea sp.</i>	Uva
PA6	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Cipreste ^a	PI77	<i>Erwinia chrysantemi</i>	Inseto ^c
PA8			PI78	<i>Erwinia piriflorigrans</i>	Inseto ^d

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Reservatório localizado fora do ambiente de vinha

^c Isolado do ambiente de vinha

^d Isolado fora do ambiente de vinha

Para as bactérias lácticas foi realizada uma amplificação de DNA com os *primers* PA e PH da qual se obteve uma banda com aproximadamente 1800 bp (dados não apresentados).

Pela observação da Tabela 7 pode verificar-se que a maioria das bactérias seleccionadas para identificação pertencem a géneros de bactérias lácticas – *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. A maioria dos isolados pertence à espécie *Lactococcus lactis*, sendo esta bactéria somente encontrada nos insetos.

No entanto, e ao contrário do referido por Bae *et al.*, (2006) e Pinto *et al.*, (2014), não foi encontrada qualquer bactéria láctica nas uvas e folhas de videira, respetivamente. Já Garijo *et al.*, (2009) também não foram capazes de isolar bactérias lácticas do ambiente de adega, na época do pintor.

Assim, pode concluir-se que de entre as bactérias isoladas existem algumas espécies pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, como é o caso de *Leuconostoc mesenteroides* (Lonvaud-Funel, 1999) e *Lactobacillus kunkeei* (Edwards *et al.*, 1998), ambos isolados de insetos recolhidos do ambiente de vinha. Este resultado encontra-se de acordo com os obtidos por Neveling *et al.*, (2012) e Vásquez *et al.*, (2012) que também isolaram *Lactobacillus kunkeei* de insetos, nomeadamente de abelhas.

Tabela 7 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias lácticas seleccionadas para identificação na época do pintor.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
Bactérias lácticas			PI16	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	Inseto ^b
PA57	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Pitósporo ^a	PI23	<i>Leuconostoc lactis</i>	Inseto ^c
PA58	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Pitósporo ^a	PI41		
PI1	<i>Vagococcus teuberi</i>	Inseto ^b	PI42	<i>Lactococcus lactis</i>	Inseto ^b
PI2	<i>Vagococcus carniphilus</i>	Inseto ^b	PI43		
PI3			PI66	<i>Enterococcus lactis</i>	Inseto ^b
PI4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Inseto ^b	Outras bactérias		
PI5	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inseto ^b	PS6	<i>Bacillus cereus</i>	Solo ^a
PI9	<i>Lactococcus lactis</i>	Inseto ^b	PS14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Solo ^a
PI10			PF31	<i>Bacillus megaterium</i>	Folha de videira

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Isolado do ambiente de vinha

^c Isolado fora do ambiente de vinha

3.5 Identificação de microrganismos isolados no verão, na época da vindima

Na época da vindima foram isolados 448 microrganismos, sendo 19% isolados de insetos, 17% das árvores, 12% de uvas sãs, 11% do mosto enriquecido, 10% dos solos, uvas danificadas e folhas de videira, 6% do mosto não enriquecido e 2% da adega (Figura 18).

Tal como nas épocas anteriores, as bactérias foram os principais microrganismos isolados. No entanto, e tal como seria de esperar, no mosto as leveduras foram os principais isolados, devido às condições pouco favoráveis para o desenvolvimento de bactérias. Porém, e ao contrário do que se verificou com o mosto não enriquecido, foram isoladas bactérias do mosto enriquecido, devido à sua concentração, tendo sido necessário um meio de enriquecimento. No mosto fermentado apenas foram isoladas leveduras, pois só estes microrganismos conseguem crescer e desenvolver-se nas condições criadas.

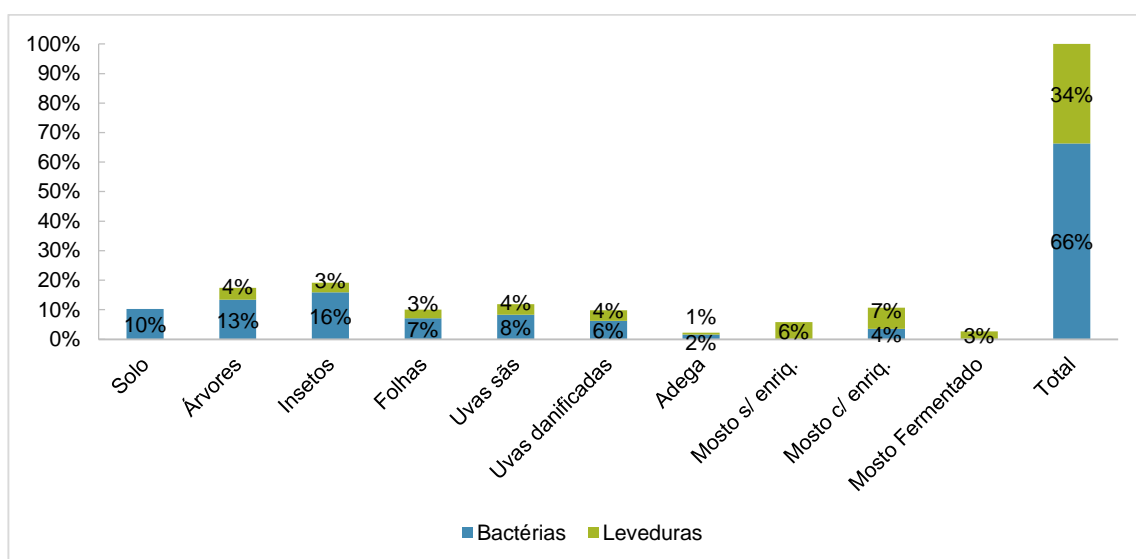


Figura 18 - Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados no verão, na época da vindima.

3.5.1 Leveduras

3.5.1.1 Testes fenotípicos

Ao contrário do que se verificou nas épocas anteriores a maioria das leveduras eram ascomicetas. Este resultado deve-se ao facto de nesta época se ter analisado também uvas danificadas e mostos que continham essencialmente leveduras ascomicetas. Assim, das 151 leveduras isoladas, foram seleccionadas para identificação 90 leveduras, sendo 1 pertencente às árvores, 4 aos insetos, 13 às uvas danificadas, 2 à adega, 26 ao mosto não enriquecido, 32 ao mosto enriquecido e 12 ao mosto fermentado.

Ao contrário do observado na época do pintor e no inverno, e como verificado na primavera, não foi isolada qualquer levedura do solo. Todavia, nos insetos, árvores, folhas de videiras e uvas sãs a maioria dos isolados eram leveduras basidiomicetas. Em relação às uvas, Raspor *et al.* (2006) concluíram que na época da vindima, em uvas sãs, por vezes existe uma maior

quantidade de basidiomicetas em detrimento de ascomicetas, dependendo da concentração de açúcar no bago de uva.

Nas uvas danificadas, e possivelmente devido à elevada concentração de açúcar dos bagos, a maioria das leveduras encontradas eram ascomicetas, tal como descrito por Barata *et al.*, (2008b).

Embora o número de leveduras isoladas da adega ter sido bastante reduzido, a maioria dos isolados eram ascomicetas. Este resultado encontra-se de acordo com Ocón *et al.* (2010) que verificaram que na adega, na época da vindima, a maioria das leveduras presentes eram ascomicetas.

Nos mostos analisados apenas foram isoladas leveduras ascomicetas, visto as condições do meio serem pouco propícias ao desenvolvimento de basidiomicetas.

3.5.1.2 Identificação dos isolados

Tal como nas épocas anteriores, a região ITS dos 90 isolados foi amplificada com sucesso, tendo-se obtido bandas com diversos tamanhos, devido à existência de diversas espécies de leveduras (dados não apresentados).

Nas Tabelas 8, 9 e 10 podem observar-se os resultados da identificação das leveduras isolados na época da vindima. A ascomiceta isolada do tronco de videira pertencia à espécie *Candida hawaiiiana*, enquanto que nos insetos recolhidos do ambiente de vinha foram encontradas leveduras de dois géneros distintos – *Hanseniaspora* (*Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora optuntiae*) e *Candida* (*Candida infanticola*).

Das uvas danificadas analisadas apenas se encontravam leveduras ascomicetas nas brancas, tendo as uvas tintas somente basidiomicetas. Assim, das uvas brancas danificadas foram isoladas diferentes leveduras pertencentes aos géneros *Pichia* e *Hanseniaspora*, sendo as espécies recolhidas *Pichia ciferrii*, *Pichia guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum*. Barata *et al.* (2008b) isolaram também de uvas danificadas *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia guilliermondii*, não tendo encontrado a espécie *Pichia ciferrii*.

Do mosto não enriquecido de uvas brancas foram isoladas leveduras dos géneros *Metschnikowia* (*Metschnikowia pulcherrima*), *Candida* (*Candida zemplinina*, *Candida diversa*, *Candida hellenica*), *Issatchenkia* (*Issatchenkia terricola*), *Pichia* (*Pichia fermentans*) e *Hanseniaspora* (*Hanseniaspora uvarum*). No entanto, no mosto enriquecido as espécies isoladas foram as mesmas, há exceção de *Issatchenkia terricola* e *Candida hellenica*, tendo sido ainda isoladas as espécies *Pichia manshurica* e *Pichia kluyveri*. Estes resultados estão de acordo com González *et al.* (2006) que isolaram também do mosto de uvas brancas, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida diversa*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Pichia kluyveri*. No entanto, no mosto fermentado foram somente isoladas as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Pichia occidentalis*, possivelmente devido à exclusão das outras espécies pelo etanol. Este resultado não está de acordo com González *et al.* (2006), que apesar de terem isolado *Saccharomyces cerevisiae*, em mosto de uvas brancas fermentado, não isolaram as outras duas espécies encontradas neste trabalho. A ausência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da *Zygosaccharomyces bailii* antes de fermentação pode

dever-se ao facto destas se encontrarem em concentrações muito reduzidas dificultando o seu isolamento.

Do mosto não enriquecido e enriquecido de uvas tintas foram isoladas as mesmas espécies de leveduras – *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* e *Candida boidinii* -, com exceção de *Pichia kluyveri*, que apenas foi isolada do mosto não enriquecido, e *Pichia manshurica* que só foi isolada do mosto enriquecido. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Granchi *et al.* (1999), Baleiras Couto *et al.* (2005) e González *et al.* (2006), que também isolaram de mosto de uvas tintas as mesmas espécies de leveduras, com exceção de *Pichia manshurica* e *Candida boidinii*.

Da adega foram isoladas duas leveduras ascomicetas, sendo *Saccharomyces cerevisiae* encontrada na prensa e *Metschnikowia pulcherrima* isolada do desengaçador. Além de terem encontrado outras leveduras no equipamento de adega, na época da vindima, Ocón *et al.* (2010) também isolaram as duas espécies referidas.

Assim, pode concluir-se que foram isoladas bastantes leveduras pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, tendo sido a maioria isoladas das uvas e mosto. Porém, foi encontrada *Hanseniaspora uvarum* num inseto recolhido no ambiente de vinha. A ausência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da *Zygosaccharomyces bailii* durante todas as épocas do ano, e em todos os reservatórios analisados, pode dever-se à sua baixa concentração devido ao domínio de outras espécies. Contudo, seria de esperar que fossem encontradas no mosto, principalmente no sujeito a enriquecimento, o que não se verificou. Este resultado pode também dever-se ao domínio de outras leveduras. Porém, no mosto fermentado (fermentação espontânea) foram isoladas estas leveduras.

Tabela 8 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na época da vindima.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
VA79	<i>Candida hawaiiiana</i>	Videira	VUP43		
VI84	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Inseto ^a	VUP44	<i>Pichia ciferrii</i>	Uva danificada ^b
VI87	<i>Candida infanticola</i>	Inseto ^a	VUP46		
VI101	<i>Hanseniaspora optuntiae</i>	Inseto ^a	VUP47		
VI102			VUP48		
VUP38	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Uva danificada ^b	VUP49	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Uva danificada ^b
VUP39			VUP50		
VUP40			VUP51		
VUP41			VM17	<i>Metschnikowia sp.</i>	Mosto s/ enriq. ^b
VUP42	<i>Pichia guilliermondii</i>	Uva danificada ^b	VM21	<i>Issatchenkia terricola</i>	Mosto s/ enriq. ^b

^a Isolado do ambiente de vinha

^b Uva branca/ Mosto branco

Tabela 9 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na época da vindima (cont).

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
VM18			VME30		
VM19			VME47		
VM20	<i>Candida zemplinina</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VME48	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Mosto c/ enriq. ^a
VM40			VME49		
VM41			VME50		
VM22			VME32	<i>Pichia fermentans</i>	Mosto c/ enriq. ^a
VM23			VME51		
VM24	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VME33		
VM44			VME34	<i>Candida zemplinina</i>	Mosto c/ enriq. ^a
VM45			VME35		
VM47			VME52		
VM37	<i>Pichia fermentans</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VME53	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mosto c/ enriq. ^a
VM38	<i>Candida diversa</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VME36		
VM39			VME37	<i>Pichia kluyveri</i>	Mosto c/ enriq. ^a
VM42	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VME54		
VM43	<i>Candida hellenica</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VME55	<i>Pichia manshurica</i>	Mosto c/ enriq. ^a
VM49			VME75	<i>Pichia manshurica</i>	Mosto c/ enriq. ^b
VM50	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Mosto s/ enriq. ^b	VME76	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Mosto c/ enriq. ^b
VM51			VME77	<i>Issatchenkia terricola</i>	Mosto c/ enriq. ^b
VM52	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Mosto s/ enriq. ^b	VME81		
VM53	<i>Pichia kluyveri</i>	Mosto s/ enriq. ^b	VME78	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Mosto c/ enriq. ^b
VM54	<i>Issatchenkia terricola</i>	Mosto s/ enriq. ^b	VME79		
VM55	<i>Candida boidinii</i>	Mosto s/ enriq. ^b	VME80	<i>Candida boidinii</i>	Mosto c/ enriq. ^b
VME22			VMF1		
VME23			VMF2	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Mosto ferment. ^a
VME24	<i>Candida diversa</i>	Mosto s/ enriq. ^a	VMF4		
VME25			VMF9		
VME26			VMF3		
VME27			VMF6	<i>Pichia occidentalis</i>	Mosto ferment. ^a
VME28	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Mosto c/ enriq. ^a	VMF11		
VME29			VMF12		

^a Mosto branco

^b Mosto tinto

Tabela 10 - Resultados da sequenciação das leveduras selecionadas para identificação na época da vindima (cont).

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
VMF5			VW21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prensa
VMF8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mosto ferment. ^a	VW23	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Desengaçador
VMF10					

^a Mosto branco

3.5.2 Bactérias

3.5.2.1 Testes fenotípicos

De acordo com os resultados dos testes fenotípicos realizados, das 297 bactérias isoladas foram selecionadas para identificação apenas 113, sendo 11 oriundas do solo, 36 das árvores, 33 dos insetos, 5 das folhas de videira, 7 das uvas sãs, 5 das uvas danificadas, 2 do mosto não enriquecido e 14 do mosto enriquecido. Destas bactérias, 54 possivelmente seriam bactérias lácticas, uma vez que eram Gram positivas e catalase e oxidase negativas, e 59 poderiam ser bactérias acéticas, visto que eram Gram negativas, oxidase negativas e catalase positivas ou negativas.

3.5.2.2 Identificação dos isolados

Para as 59 prováveis bactérias acéticas, foi efetuada uma amplificação de DNA com os *primers* Ac1 e Ac3 da qual se obteve uma banda com aproximadamente 1000 bp (dados não apresentados). De forma a confirmar a identidade dos produtos de PCR obtidos anteriormente foi realizado um *nested* PCR, com os *primers* AcA e AcB. Deste PCR, 38 bactérias apresentaram uma banda com cerca de 1000 bp e 21 exibiram uma banda com aproximadamente 550 bp, sendo este o tamanho esperado para as bactérias acéticas (dados não apresentados). Desta forma, foram selecionadas para sequenciação 21 bactérias.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados da sequenciação das bactérias acéticas selecionadas para identificação na época da vindima. Assim, pode verificar-se que, das 21 bactérias selecionadas para sequenciação, só as isoladas do solo recolhido do ambiente de vinha pertenciam à família *Acetobacteraceae*, sendo os géneros encontrados *Gluconobacter* (*Gluconobacter cerinus* e *Gluconobacter oxydans*) e *Acidiphilium*.

Contudo, nenhuma das bactérias isoladas dos troncos das árvores, insetos, uvas sãs e mosto pertencia à família *Acetobacteraceae*, mas sim às famílias *Enterobacteriaceae* (*Raoultella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Cronobacter* sp., *Kluyvera* sp. e *Serratia* sp.) e *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* sp.).

Em conclusão, na época da vindima apenas foram isoladas duas espécies de bactérias acéticas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho – *Gluconobacter oxydans* e *Gluconacetobacter*

cerinus (Joyeux *et al.*, 1984; Navarro *et al.*, 2013) -, sendo as duas oriundas do solo recolhido do ambiente de vinha.

Tabela 11 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias acéticas selecionadas para identificação na época da vindima.

Código	Espécie	Reservatório	Código	Espécie	Reservatório
Bactérias acéticas			VI37	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Inseto ^b
VS1	<i>Gluconobacter cerinus</i>	Solo ^a	VI51	<i>Enterobacter absuriae</i>	Inseto ^b
VS3			VI59	<i>Escherichia coli</i>	Inseto ^b
VS5	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a	VI63	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Inseto ^b
VS6	<i>Acidiphilium sp.</i>	Solo ^a	VI68	<i>Serratia marcescens</i>	Inseto ^b
VS7	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Solo ^a	VUS4	<i>Pseudomonas protegens</i>	Uvas sãs ^c
Outras bactérias			VME43	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Mosto c/ enriq. ^c
VA1	<i>Raoultella terrigena</i>	Sobreiro ^a	VME45		
VA15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Pitósporo ^a	VME71	<i>Escherichia coli</i>	Mosto c/ enriq. ^c
VA37	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sobreiro ^a	VME72		
VA49	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Videira	VME73		
VI23	<i>Escherichia coli</i>	Inseto ^b			

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Isolado do ambiente de vinha

^c Uva branca/ Mosto branco

As 54 supostas bactérias lácticas foram submetidas a uma amplificação de DNA com os *primers* PA e PH da qual se obteve uma banda com aproximadamente 1800 bp (dados não apresentados).

Na Tabela 12 pode verificar-se que a maioria das bactérias selecionadas para identificação pertencem a géneros de bactérias lácticas – *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Fructotobacillus*. Contudo, os insetos foram o único reservatório onde foram encontradas bactérias lácticas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, sendo no entanto, apenas isolada uma espécie (*Leuconostoc mesenteroides*).

Em concordância com Bae *et al.* (2006) e Nisiotou *et al.* (2011) também, em uvas sãs e danificadas, não foram encontradas quaisquer bactérias lácticas pertencentes ao consórcio do vinho. Nos mostos enriquecidos e não enriquecidos também não foi encontrada qualquer bactéria láctica respeitante à microbiota do vinho, ao contrário do verificado por Lafon-Lafourcade *et al.* (1983) que, nos primeiros dias da fermentação alcoólica foram capazes de isolar, quer em mostos tintos quer em brancos, *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum*. Porém, e já de acordo com Lafon-Lafourcade *et al.* (1983) não foi encontrada qualquer bactéria láctica no mosto fermentado, devido ao domínio das leveduras.

Tabela 12 - Resultados da sequenciação das possíveis bactérias lácticas selecionadas para identificação na época da vindima.

Código	Espécie	Reservatório
Bactérias lácticas		
VS26	<i>Enterococcus lactis</i>	VI42
VS36	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Solo ^a
VS39	<i>Enterococcus faecium</i>	Solo ^a
VS48	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Solo ^a
VA41	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Cipreste ^a
VA42		
VA43	<i>Enterococcus faecium</i>	Cipreste ^a
VA58	<i>Enterococcus faecium</i>	Zambujeiro ^a
VA59		
VI4	<i>Lactococcus lactis</i>	Inseto ^b
VI5		
VI6		
VI7	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inseto ^b
VI8		
VI9	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Inseto ^b
VI10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Inseto ^b
VI11		
VI12		
VI14	<i>Enterococcus hirae</i>	Inseto ^b
VI16		
VI18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inseto ^b
VI19		
VI20	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inseto ^b
VI22		
VI25		
VI31	<i>Enterococcus faecalis</i>	Inseto ^b
VI32		

^a Reservatório localizado no ambiente de vinha

^b Isolado do ambiente de vinha

^c Isolado fora do ambiente de vinha

^d Uvas brancas/ Mosto branco

Código	Espécie	Reservatório
VI41	<i>Lactococcus lactis</i>	Inseto ^c
VI42		
VI43	<i>Enterococcus faecium</i>	Inseto ^a
VI44	<i>Enterococcus mundtii</i>	Inseto ^a
VI45	<i>Enterococcus lactis</i>	Inseto ^b
VI50	<i>Enterococcus absuriae</i>	Inseto ^b
VF28	<i>Enterococcus sp.</i>	Folha de videira
VF29	<i>Enterococcus faecium</i>	Folha de videira
VF30	<i>Enterococcus faecalis</i>	Folha de videira
VF31		
VUS24	<i>Enterococcus raffini</i>	Uvas sãs ^d
VUS26	<i>Enterococcus pallens</i>	Uvas sãs ^d
VUP29	<i>Fructobacillus tropaeoli</i>	Uvas sãs ^d
VUP30		
VUP32		
VM13	<i>Lactococcus lactis</i>	Mosto s/ enriq. ^d
VM14		
VME34	<i>Lactococcus lactis</i>	Mosto s/ enriq. ^d
VME35		
VME36		
VME37		
VME38		
VME39		
VME40		
Outras bactérias		
VI58	<i>Bacillus sp.</i>	Inseto ^a
VF15	<i>Bacillus nealsonii</i>	Folha de videira
VUS25	<i>Bacillus subtilis</i>	Uvas sãs ^d

3.6 Avaliação da diversidade microbiana da vinha, ao longo de todo o ano

Na Figura 19 encontra-se a contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados em cada época do ano. Quanto às leveduras (Figura 19A), pode observar-se que a época que mais contribuiu para os isolamentos, ao longo de todo o ano, foi o pintor (36%), seguida da primavera (27%), vindima (20%) e inverno (17%). Tanto na primavera como no pintor, os insetos foram os principais contribuidores para o total de isolamentos, tendo contribuído com 17% e 12%, respetivamente. Contudo, tanto no inverno como na vindima, foram as árvores que mais contribuíram para o total de isolamentos, com 10% e 5%.

No que toca às bactérias (Figura 19B), é de notar que houve um aumento do número de isolado ao longo do ano. Desta forma, a vindima foi a época do ano que mais contribuiu para o número de isolados, com 30%, seguida do pintor (27%), primavera (23%) e inverno (17%). O aumento da quantidade de isolados na vindima e no pintor deveu-se em grande parte ao incremento do número de reservatórios analisados. É ainda de salientar que, em todas as épocas, exceto no inverno, os insetos foram dos reservatórios que mais contribuíram para os isolamentos, com 7% dos isolados na primavera, 9% no pintor e 8% na vindima. Contudo, no inverno, o reservatório que mais contribuiu foi o solo, com 9%.

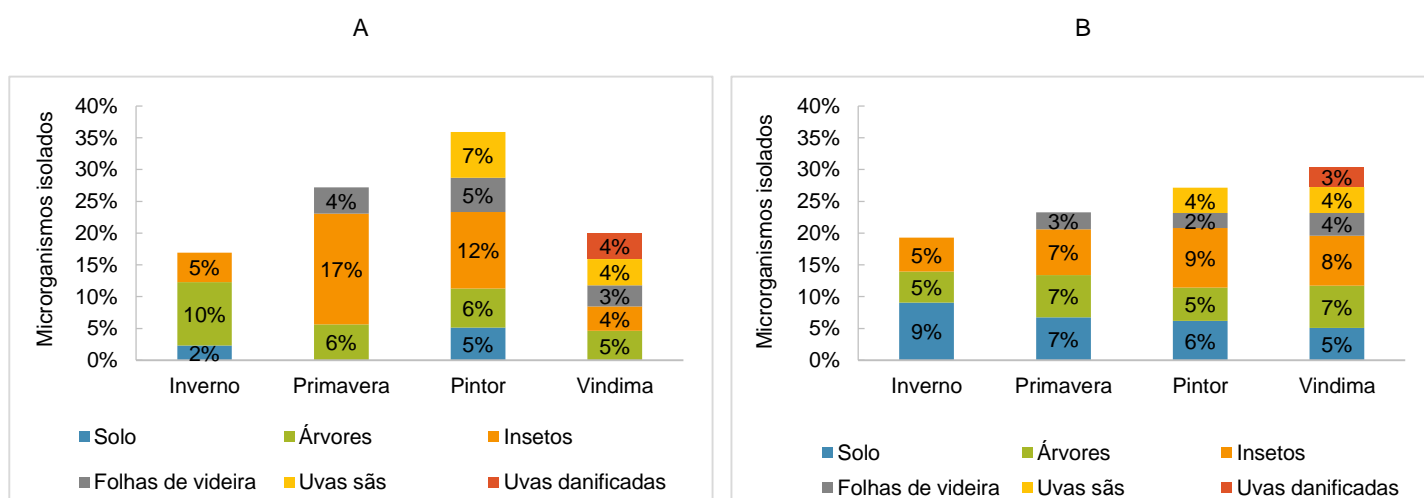


Figura 19 – Contribuição de cada reservatório para os microrganismos isolados ao longo do ano. (A) Leveduras, (B) Bactérias.

Na Figura 20 está representada a permanência dos microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, em cada reservatório analisado, ao longo do ano. Como se pode verificar, as épocas em que houve uma maior preponderância de leveduras pertencentes ao consórcio microbiano (Figura 20A) do vinho foram o inverno (6%) e a vindima (18%). No inverno estes microrganismos foram isolados apenas dos troncos das árvores, enquanto que na vindima a maioria foi isolada das uvas danificadas. Contudo, é ainda de notar que, ao longo de todo o ano, a quantidade de leveduras

pertencentes ao consórcio microbiano do vinho era diminuta. É também de referir que se os reservatórios não existentes no inverno forem excluídos da época de vindima, a percentagem de microrganismos pertencentes ao consórcio seria de 5%.

No que toca às bactérias, a altura do ano em que se notou uma maior predominância das bactérias pertencentes à microbiota da vinha (Figura 20B) foi o inverno (6%), devido à existência de bactérias acéticas no solo e nos troncos de árvores. No entanto, nesta época do ano não foram encontradas quaisquer bactérias lácticas. Tal como se observou com as leveduras, o número de bactérias pertencentes ao consórcio do vinho, isoladas ao longo do ano, foi bastante reduzido.

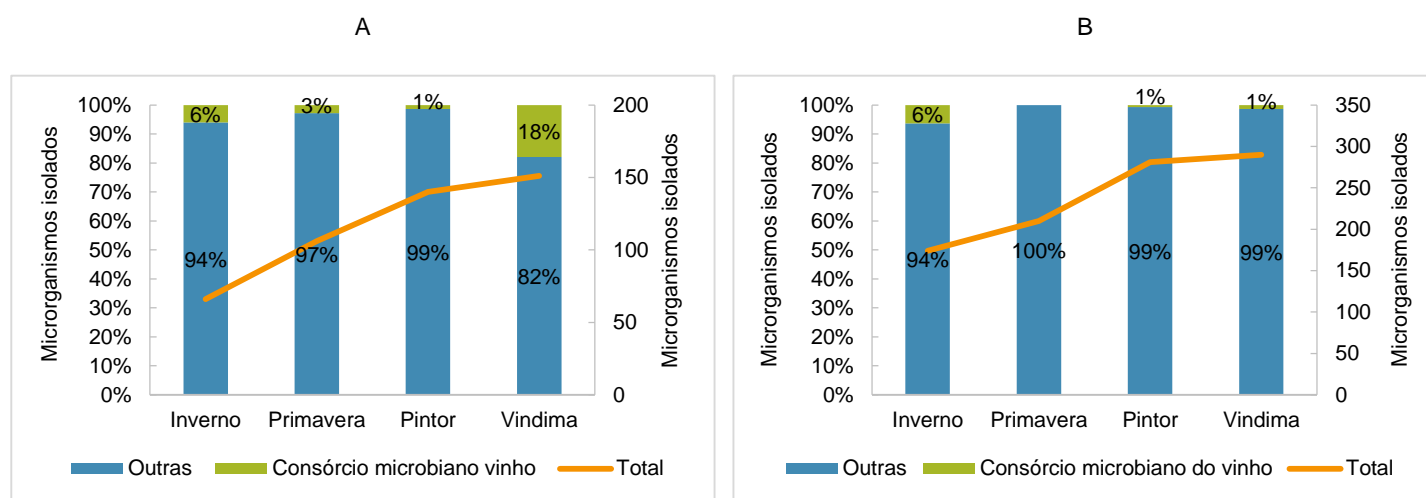


Figura 20 – Preponderância dos microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, por reservatório, ao longo do ano. (A) Leveduras, (B) Bactérias.

Na Figura 21 é possível observar a quantidade de espécies isoladas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, por reservatório, ao longo do ano. Como se pode verificar, ao longo de todo o ano, foi possível isolar espécies de leveduras associadas à microbiota do vinho (Figura 21A), tendo-se notado um ligeiro aumento da sua preponderância ao longo do mesmo. É ainda de salientar que em todas as épocas analisadas, exceto no inverno, foram isoladas leveduras dos insetos. Contudo, apenas foram isoladas das árvores, leveduras do consórcio, no inverno e na época do pintor. Na vindima, observou-se um ligeiro aumento do número de isolamentos devido à análise de uvas danificadas, ricas em açúcar, o que potencia o aparecimento de leveduras ascomicetas (Barata *et al.*, 2008b).

No que toca às bactérias acéticas pertencentes ao consórcio, é de referir que estas somente foram isoladas no inverno e na época da vindima. Tanto no inverno como na vindima estes microrganismos foram encontrados no solo, sendo que na primeira época referida também foram isolados de uma árvore. A existência de acéticas no solo, nas épocas mencionadas, pode dever-se à presença de uvas danificadas neste ambiente.

As bactérias lácticas pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, apenas foram isoladas na época do pintor e da vindima, em insetos capturados no ambiente de vinha. Este resultado pode dever-se ao aumento da atividade de insetos polinizadores, nesta época do ano, que transportam no seu corpo diversas bactérias lácticas, estando muitas delas associadas à microbiota do vinho (Vásquez *et al.*, 2012).

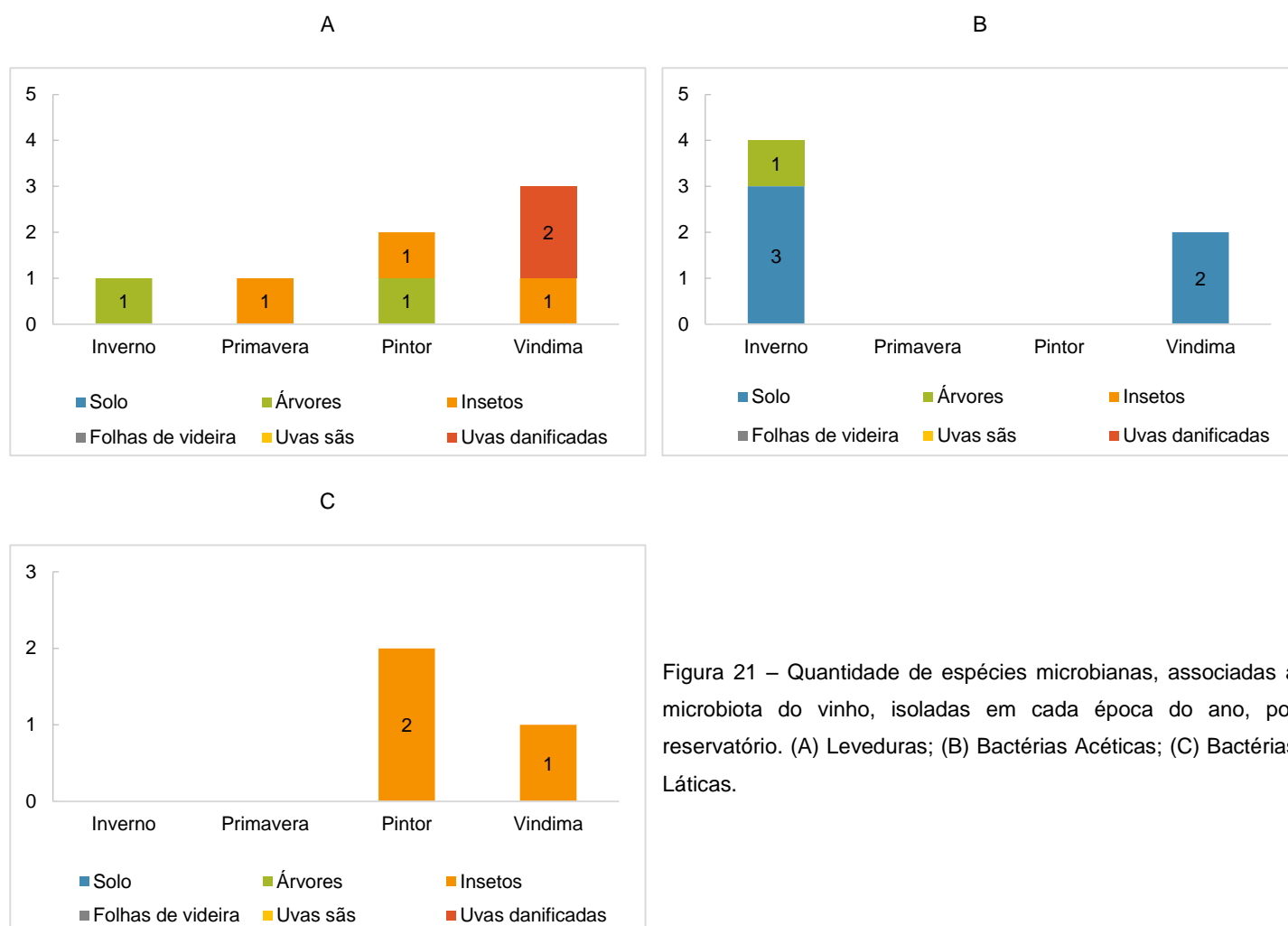


Figura 21 – Quantidade de espécies microbianas, associadas à microbiota do vinho, isoladas em cada época do ano, por reservatório. (A) Leveduras; (B) Bactérias Acéticas; (C) Bactérias Lácticas.

3.7 Origem e disseminação dos microrganismos do consórcio microbiano do vinho

Na Tabela 13 encontram-se referidas todas as espécies pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, isoladas ao longo do ano. Desta forma, pode concluir-se que foram recolhidas 14 espécies de ascomicetas associadas a esta bebida. Três das espécies, ou seja, *Candida apicola*, *Candida parapsilopsis* e *Hanseniaspora uvarum* foram isoladas de insetos, sendo a última espécie também encontrada em uvas danificadas e mosto. Estes resultados encontram-se de acordo com Rosa *et al.* (2003), Sandhu e Waraich (1985) e Barata *et al.*, (2012b) que isolaram as três espécies referidas de insetos, respetivamente. A presença de *Hanseniaspora uvarum* em uvas danificadas encontra-se

também de acordo com Barata *et al.* (2008b) que as isolou de uvas danificadas e com González *et al.* (2006) que isolaram a mesma espécie no mosto.

Ao longo do ano, foram também recolhidas as espécies *Debaryomyces hansenii*, de árvores, tal como relatado em Rao *et al.* (2008), e *Pichia guilliermondii*, de uvas danificadas, como descrito em Barata *et al.* (2008b).

Do mosto em início de fermentação foram isoladas as espécies *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, *Candida diversa*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia kluyveri*. O facto de estas leveduras terem sido isoladas do mosto, mas não das uvas, pode sugerir a sua baixa concentração neste fruto e possivelmente a sua diminuta preponderância no ambiente relacionado com a vinha. Estes resultados encontram-se em concordância com vários autores, que isolaram de mosto em início de fermentação as mesmas espécies, há exceção de *Pichia fermentans* e *Candida zemplinina* (Granchi *et al.*, 1999; Baleiras Couto *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006). Do mosto fermentado (fermentação espontânea) foi isolada a principal levedura responsável pela fermentação alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*) e ainda *Metschnikowia pulcherrima*. O isolamento de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser devido à depleção gradual do nível de nutrientes e ao aumento progressivo da concentração de etanol do mosto, o que permitiu a predominância desta levedura em relação às anteriormente isoladas (Heard e Fleet, 1985).

A maioria das bactérias acéticas pertencentes ao consórcio do vinho foram isoladas dos solos (*Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter cerinus*, *Gluconacetobacter liquefaciens* e *Acetobacter tropicalis*), tendo a primeira espécie referida sido também encontrada em árvores. Contudo, como referido anteriormente não estavam ainda relatados isolamentos de bactérias acéticas quer em solos, quer em árvores sendo este o primeiro resultado indicador da sua presença.

Ao longo do ano, apenas foram isoladas duas espécies de bactérias lácticas associadas ao consórcio do vinho – *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus kunkeei*, tendo sido ambas encontradas em insetos. Neveling *et al.* (2012) relataram também o isolamento de *Lactobacillus kunkeei*, de insetos, enquanto Cox e Gilmore (2007) foram também capazes de isolar, de insetos, *Leuconostoc mesenteroides*.

Em suma, pode concluir-se que a presença de um grande número de espécies pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, na época da vindima, nas uvas e mosto, não aumenta a sua disseminação pelos outros reservatórios analisados. É ainda de salientar, que ao longo do ano a preponderância dos microrganismos do consórcio é bastante diminuta, não tendo sido isolada, a não ser da adegas e do mosto fermentado, a principal levedura responsável pela fermentação do vinho – *Saccharomyces cerevisiae*. A principal bactéria responsável pela fermentação malolática – *Oenococcus oeni* – nunca foi isolada de qualquer reservatório analisado, o que pode indicar a sua baixa concentração em todos os reservatórios analisados. Como a levedura *Hanseniaspora uvarum*

foi o microrganismo mais isolado dos reservatórios analisados, este microrganismo pode ser um indicador da presença de microrganismos do consórcio microbiano do vinho.

Tabela 13 – Origem e Disseminação dos microrganismos associados ao consórcio microbiano do vinho.

Espécie (nº isolamentos)	Reservatório (nº amostras analisadas)	Época do ano
Leveduras ascomicetas		
<i>Debaryomyces hansenii</i> (5)	Árvores (7)	Inverno, pintor
<i>Candida parapsilopsis</i> (4)	Insetos (25)	Primavera
<i>Candida apicola</i> (1)	Insetos (25)	Pintor
<i>Candida diversa</i> (7)	Mosto (2)	Vindima
<i>Candida zemplinina</i> (5)	Mosto (2)	Vindima
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (17)	Insetos (25), uvas danificadas (5), mosto (2)	Vindima
<i>Pichia guilliermondii</i> (1)	Uvas danificadas (5)	Vindima
<i>Pichia fermentans</i> (3)	Mosto (2)	Vindima
<i>Pichia kluyveri</i> (4)	Mosto (2)	Vindima
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (3)	Mosto (2), adega (5)	Vindima
<i>Issatchenkia terricola</i> (4)	Mosto (2)	Vindima
<i>Lachancea thermotolerans</i> (5)	Mosto (2)	Vindima
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)	Mosto (2), adega (5)	Vindima
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (3)	Mosto (2)	Vindima
Bactérias acéticas		
<i>Gluconobacter oxydans</i> (9)	Solos (6), árvores (7)	Inverno, vindima
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> (1)	Solos (6)	Inverno
<i>Gluconobacter cerinus</i> (1)	Solos (6)	Vindima
<i>Acetobacter tropicalis</i> (1)	Solos (6)	Inverno
Bactérias lácticas		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (3)	Insetos (25)	Pintor, vindima
<i>Lactobacillus kunkeei</i> (1)	Insetos (25)	Pintor

4. Conclusões

O consórcio microbiano do vinho é constituído por inúmeros microrganismos, tais como leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, podendo estes influenciar positiva ou negativamente a produção desta bebida. Contudo, apesar de se reconhecer que a maioria destes microrganismos são oriundos das uvas, ainda se encontra por esclarecer qual a sua origem e persistência no ambiente próximo das vinhas, ao longo do ano.

Assim, no presente trabalho, foram analisados, ao longo de um ano, diversos ambientes propícios ao aparecimento de microrganismos relacionadas com o vinho, como solos, árvores, insetos, folhas de videira e, posteriormente, uvas, tendo-se avaliado a diversidade microbiana associada aos mesmos. De forma a verificar se os microrganismos encontrados nestes ambientes correspondiam aos encontrados no vinho, foi ainda analisado o mosto e equipamento de adega.

Deste modo, foi possível concluir que, ao longo do ano, existe uma enorme diversidade de microrganismos nestes ambientes, embora a grande maioria não esteja associada ao consórcio microbiano do vinho representando apenas cerca de 5% do total de 1425 microrganismos isolados ao longo do ano. Não obstante, foram isolados alguns microrganismos associados ao vinho, em insetos, árvores e solos e, como seria de esperar, em uvas danificadas e mosto. No entanto, não foi encontrada qualquer levedura ascomiceta, bactéria láctica ou bactéria acética em folhas de videira ou em uvas sãs. No mosto e no equipamento de adega também não foi isolada qualquer bactéria láctica ou acética. Foi também possível verificar que a comunidade microbiana é semelhante em pontos localizados perto e longe da vinha, embora nos últimos não tenham sido isolados microrganismos pertencentes ao consórcio do vinho.

Nos ambientes analisados, não foi isolado nenhum dos principais microrganismos responsáveis pelo fabrico de vinho – *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni* -, apesar de o primeiro ter sido encontrado no mosto, após 10 dias de fermentação, e na adega. A presença de várias leveduras associadas à microbiota do vinho – *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, *Candida diversa*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Lachancea thermotolerans* e *Zygosaccharomyces bailii* – em mosto mas nunca nos reservatórios analisados, sugere que estas leveduras se encontram em baixas concentrações no ambiente e nas uvas.

Em suma, pode concluir-se que a predominância dos microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho é bastante baixa, ao longo de todo o ano; e que, provavelmente, grande parte dos microrganismos pertencentes ao consórcio se encontra em baixas concentrações nos ambientes analisados, não tendo sido por isso possível isolá-los. Assim, seria interessante analisar novamente os mesmos locais de modo a confirmar ou identificar alterações de ano para ano e proceder a um enriquecimento mais seletivo das amostras recolhidas na tentativa de identificar espécies do consórcio em ambiente de vinha.

5.Referências Bibliográficas

- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F., Widmer, F., 2007. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*. 59, 600–610.
- Bae, S., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*. 100, 712–727.
- Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L., 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 102, 49–56.
- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008a. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 1182–1191.
- Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., Loureiro, V., 2008b. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*. 8, 1008–1017.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012a. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 153, 243–259.
- Barata, A., Santos, S.C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012b. New insights into the Ecological Interaction Between Grape Berry Microorganisms and Drosophila flies During the Development of Sour Rot. *Microbial Ecology*. 64, 416-430.
- Barbe, J.C., De Revel G, Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 2001. Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 34–42.
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*. 48, 149–156.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P. A, 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine -- a review. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 60-70.
- Bell, S., Henschke, P., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11, 242-295.
- Bhadra, B., Rao, R.S., Singh, P.K., Sarkar, P.K., Shivaji, S., 2008. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. *Current Microbiology*. 56, 489–494.

- Bisson, L.F., Joseph, C.M., 2009. Yeasts., in: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 47–60.
- Bisson, L.F., Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E., Walker, M.A., Lapsley, J.T., 2002. The present and future of the international wine industry. *Nature*. 418, 696–699.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111, 139–148.
- Botha, A., 2006. Yeasts in Soil, in: Péter, G., Rosa, C. (Eds.), *The Yeast Handbook - Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 222–240.
- Brysch-Herzberg, M., 2004. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology*. 50, 87–100.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M. V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*. 26, 801–808.
- Chen, Y.-S., Yanagida, F., Shinohara, T., 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*. 40, 195–200.
- Chouaia, B., Gaiarsa, S., Crotti, E., Comandatore, F., Degli Esposti, M., Ricci, I., Alma, A., Favia, G., Bandi, C., Daffonchio, D., 2014. Acetic acid bacteria genomes reveal functional traits for adaptation to life in insect guts. *Genome Biology and Evolution*. 6, 912–920.
- Chrysohoou, C., Stefanadis, C., 2013. Longevity and diet. Myth or pragmatism? *Maturitas*. 76, 303–307.
- Ciani, M., Ferraro, L., 1997. Role of Oxygen on Acetic Acid Production by *Brettanomyces* / *Dekkera* in Winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 489–495.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D., Valero, E., 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 145, 132–139.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*. 25, 422–427.
- Cox, C.R., Gilmore, M.S., 2007. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infection Immunity*. 75, 1565–1576.

- Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., Sacchi, L., Bourtzis, K., Mandrioli, M., Cherif, A., Bandi, C., Daffonchio, D., 2010. Acetic Acid Bacteria , Newly Emerging Symbionts of Insects. *Applied and Environmental Microbiology*. 76, 6963–6970.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C., Vorholt, J. a, 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106, 16428–16433.
- Domizio, P., Romani, C., Comitini, F., Gobbi, M., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2010. Potential spoilage non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*. 61, 137–144.
- Du Toit, M., Pretorius, I.S., 2000. Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature's Own Arsenal - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21, 74–96.
- Du Toit, W.J., Lambrechts, M.G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 74, 57–64.
- Du Toit, W.J.D.U., Pretorius, I.S., 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*. 179, 155–179.
- Edwards, C.G., Haag, K.M., Collins, M.D., Hutson, R. a, Huang, Y.C., 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 698–702.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, C.E., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 17, 7843–7853.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A., 1998. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology*. 1, 143–148.
- Fernández-Espinar, M.T., Llopis, S., Querol, A., Barrio, E., 2011. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts, in: Carrasco, A. V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 111–141.
- Ferreira, A.M., Clímaco, M.C., Faia, A.M., 2001. The role of non- Saccharomyces species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 67–71.

- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., Ouzari, H., 2013. Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *Biomed International Research*. 2013, 405708.
- Fleet, G., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 11–22.
- França, L.T.C., Carrilho, E., Kist, T.B.L., 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35, 169–200.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007a. Managing Microbial Growth, in: *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, pp. 65–81.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007b. Lactic acid bacteria, in: Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (Eds.), *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, pp. 29–44.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007c. Identification of Wine Microorganisms, in: *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, pp. 241–272.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007d. Yeasts, in: Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (Eds.), *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, pp. 3–28.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007e. Other Technologies for Identification and Enumeration, in: Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (Eds.), *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures*. Springer, New York, pp. 273–289.
- Ganga, M. a., Martinez, C., 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 76–83.
- Ganter, P.F., 2006. Yeast and Invertebrate Associations, in: Péter, G., Rosa, C. (Eds.), *The Yeast Handbook - Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 303–370.
- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, a R., 2009. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. *International Journal of Food Microbiology*. 136, 142–146.
- Gerbaux, V., Meistermann, E., Cottureau, P., Barriere, C., Cuinier, C., Berger, J.L., Villa, A., 1999. Use of lysozyme in enology. *Bulletin de l'OIV*. 72, 348–373.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*. 102, 295–304.

González, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2006. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology*. 102, 1018–1025.

Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., Ley, J.D.E., 1983. Numerical Analysis of Phenotypic Features and Protein Gel Electropherograms of *Gluconobacter Asai* 1935 emend . mut . char . Asai , Iizuka , and Komagata 1964. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 65–81.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, a., Vincenzini, M., 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 949–956.

Guerra, E., Sordi, G., Mannazzu, I., F., C., Fatichenti, F., 1999. Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. *Italian Journal of Food Science*. 11, 221–230.

Guillamón, J., Mas, A., 2011. Acetic Acid Bacteria, in: Carrasco, A., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. San Diego, pp. 227–255.

Hasler, C.M., 1998. Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*. 52, 61–72.

Heard, G.M., Fleet, G.H., 1985. Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines. *Applied Environmental Microbiology*. 50, 727–729.

Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*. 865–876.

Heresztyn, T., 1986. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology*. 96–98.

International Organisation of Vine and Wine, 2012. Statistical report on world vitiviniculture.

International Organisation of Vine and Wine, 2013a. Vine and Wine Outlook 2008-2009.

International Organisation of Vine and Wine, 2013b. Statistical report on world vitiviniculture.

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of Acetic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 48, 153–156.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V., 2011. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier B.V., London, pp. 87–110.

- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P., 1983. Occurrence of lactic Acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*. 46, 874–880.
- Leifert, W., Abeywardena, M., 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*. 28, 729-737.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., Toit, M., 2010. Malolactic Fermentation : The ABC ' s of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 31, 186–212.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 317–331.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 23–50.
- Maicas, S., Gil, J., Pardo, I., Ferrer, S., 1999. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*. 32, 491-496.
- Malfeito-Ferreira, M., 2011. Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*. 1, 95–102.
- Malfeito-Ferreira, M., 2014. Wine Spoilage Yeasts and Bacteria, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, Academic Press, pp. 805–810.
- Martinson, V., Danforth, B., Minckley, R., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N., 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*. 20, 619-628.
- Martineau, B., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1995. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Research International*. 28, 139–143.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V., Querol, A., 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*. 106, 79–84.
- Mas, A., Torija, M.J., González, A., Poblet, M., Guillamón, J.M., 2007. Acetic acid bacteria in oenology. *Contributions to Science*. 3, 511–521.
- Mateo, E., Torija, M.J., Mas, A., Bartowsky, E.J., 2014. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*. 178, 98–106.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*. 30, 136–141.

- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Muñoz, R., 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 84, 117–123.
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*. 150, 199–204.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V., de las Rivas, B., 2011. Lactic Acid Bacteria, in: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 191–226.
- Navarro, D., Mateo, E., Torija, M^aj., Mas, A., 2013. Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria*. 2, 19–23.
- Neveling, D.P., Endo, A., Dicks, L.M.T., 2012. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Current Microbiology*. 65, 507–515.
- Nisiotou, A. a, Rantsiou, K., Iliopoulos, V., Cocolin, L., Nychas, G.-J.E., 2011. Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. *International Journal of Food Microbiology*. 145, 432–436.
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, a. R., 2013a. Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. *Food Control*. 34, 261–267.
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, a. R., 2013b. Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control*. 30, 585–589.
- Ocón, E., Gutiérrez, a. R., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., 2010. Presence of non-Saccharomyces yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology*. 27, 1023–1027.
- Orsi, N., Fabozzi, G., Ambrosi, C., Visca, P., 2004. Is there an answer? Is it better for a bacterium to be gram-positive or gram-negative? *Life*. 56, 361–363.
- Pérez-López, F.R., Chedraui, P., Haya, J., Cuadros, J.L., 2009. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*. 64, 67–79.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *Public Library of Science*. 9, e85622.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*. 20, 217–224.

Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., Mas, A., 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*. 31, 63–67.

Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16, 675–729.

Pretorius, I.S., van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 20, 61–74.

Rankine, B., Fornachon, J.C., Bridson, D.A., 1969. Diacetyl in australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis*. 129–134.

Rao, R.S., Bhadra, B., Shivaji, S., 2008. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology*. 47, 19–24.

Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*. 109, 97–102.

Regulamento (CE) nº606/2009. Regras de execução do Regulamento (CE) nº 479/2008 do Conselho no que respeita às categorias de produtos vitivinícolas, às práticas enológicas e às restrições que lhes são aplicáveis. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 59p.

Regulamento (CE) nº643/2006. Normas de execução do Regulamento (CE) nº 1493/1999, que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, e constitui um código comunitário das práticas e tratamentos enológicos, bem como o Regulamento (CE) nº 884/2001 que estabelece regras de execução relativas aos documentos de acompanhamento do transporte de produtos vitivinícolas e aos registos a manter no sector vitivinícola. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 4p.

Renaud, S., de Lorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 339, 1523–1526.

Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97, 4105–4119.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape Wine Research*. 11, 316–327.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 75, 149–164.

Riedel, H., Min, N., Thaw, M., Akumo, D.N., 2012. Wine as Food and Medicine, in: Riedel, H., Saw, N., Akumo, D., Kütük, O., Smetanska, I. (Eds.), *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. InTech, pp. 399–418.

Roberts, G.D., Horstmeier, C.D., Land, G.A., Foxworth, J.H., 1978. Rapid Urea Broth. *Journal of Clinical Microbiology*. 7, 584–588.

Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 412–422.

Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 588–599.

Romero, S. V, Bordons, A., Franquet, R., Masqué, M.C., 2009. Potential Formation of Ethyl Carbamate by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* at Different Conditions in Simulated Wine. *International Journal of Food Science and Technology*. 1206–1213.

Rosa, C., Lachance, M., Silva, J., Teixeira, a, Marini, M., Antonini, Y., Martins, R., 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*. 4, 271–275.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*. 157, 267–274.

Sandhu, D.K., Waraich, M.K., 1985. Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar. *Microbial Ecology*. 11, 51–58.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74, 5463–5467.

Schuller, D., Côte-Real, M., Leão, C., 2000. A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *Journal of Food Protection*. 1570–1575.

Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.C., Bauer, F., 2012. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *Public Library of Sciences*. 7, 1–11.

Shalaby, A.R., 1997. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29, 675–690.

- Sieiro, C., Cansado, J., Agrelo, D., Velázquez, J.B., Villa, T.G., 1990. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 2936–2938.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., Velázquez, E., 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 56, 21–24.
- Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G., Fingerman, E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Research*. 1, 299–306.
- Spencer, D.M., Spencer, J.F.T., Garro, O., Fengler, E., 1996. Yeasts and leguminous trees in Argentina and Europe. *Mycologist*. 10, 126–130.
- Steel, K.J., 1961. The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. *Journal of General Microbiology*. 25, 297–306.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P. a., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape Wine Research*. 11, 139-173.
- Sylhavi, K., Mandl, K., 2006. *Acetobacter tropicalis* in spontaneously fermented wines with vinegar fermentation in Austria. *Mitteilungen Klosterneubg*. 56, 102–107.
- Taylor, W.I., Achanzar, D., 1972. Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Applied Microbiology*. 24, 58–61.
- Uthurry, C. a., Lepe, J. a. S., Lombardero, J., García Del Hierro, J.R., 2006. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*. 94, 262–270.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekeley, L., Olofsson, T.C., 2012. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *Public Library of Sciences*. 7, e33188.
- Versari, A., Parpinello, G.P., Cattaneo, M., 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*. 23, 447–455.
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., 2004. Techniques of Molecular Biology, in: Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (Eds.), *Molecular Biology of the Gene*. Pearson Education, Inc, New York, pp. 647–680.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics., in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.

(Eds.), *Pcr Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

Willey, J., Sherwood, L., Christopher, W., 2008b. Microbial Genomics, in: Willey, J., Sherwood, L., Christopher, W. (Eds.), *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*. McGraw-Hill, New York, pp. 383–406.

Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C., 2008a. Microorganisms in Terrestrial Environments, in: Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, C. (Eds.), *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*. McGraw-Hill, New York, pp. 667–689.

Wuczkowski, M., Prillinger, H., 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). *Microbiological Research*. 159, 263–275.

Yurkov, a. M., Kemler, M., Begerow, D., 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*. 5, 24–35.

Zacchi, L., Vaughan-Martini, A., 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia , Italy. *Annals of Microbiology*. 244, 237–244.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non- *Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 197–203.

6. Anexos

ANEXO 1 – LOCALIZAÇÃO DOS LOCAIS DE RECOLHA DAS AMOSTRAS

A



B



C



D



(A) Solos: 1, zona de vinha; 2, zona florestal. (B) Árvores: 1, sobreiro; 2 e 6, cipreste; 3, videira; 4, pitósporo; 5, oliveira. (C) Insetos: 1, zona de vinha; 2, zona florestal. (D) Folhas de videira e uvas: 1, zona de vinha.